

Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Leiter: Prof. Dr. R. Lill

Die Rolle der Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8 im apikalen Transport der Saccharase-Isomaltase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Patrick Wenzel
aus Ebersdorf



Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 06.08.2009
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan : Prof. Dr. Rothmund
Referent : Prof. Dr. Ralf Jacob
Korreferent : Prof. Dr. Andrea Maisner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Epithelzelle	1
1.2 Polarer Proteintransport	3
1.2.1 Basolateraler Transport in Epithelzellen	4
1.2.2 Apikaler Transport in Epithelzellen	5
1.3 <i>Trans</i> -Golgi Netzwerk und endosomale Kompartimente.....	11
1.4 Aspekte des Zytoskeletts im polaren Proteintransport.....	13
1.5 Der Exocyst-Komplex	14
1.6 Die Saccharase-Isomaltase als Modellprotein.....	19
1.7 Aufgabenstellung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	21
2.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	23
2.3 Puffer und Lösungen	25
2.4 Immunologische Reagenzien	28
2.5 Konstrukte	28
2.6 RNA-Interferenz	28
2.7 Zellkultur	29
2.7.1 Kultivierung.....	29
2.7.2 Zelllinien.....	29
2.7.3 Passagieren der Zellen.....	31
2.7.4 Einfrieren und Auftauen	31
2.8 Transfektions-Methoden	31
2.8.1 DEAE-Dextran Transfektion von COS-7-Zellen	31
2.8.2 Lipofectamin TM 2000 Transfektion von MDCK-Zellen.....	32
2.8.2.1 Transfektion von MDCK-SI-Zellen auf Transmembranfiltern.....	32
2.8.2.2 Transfektion von MDCK-SI-Zellen in Kulturschalen	33
2.9 Fluoreszenzmikroskopische Anwendungen	34
2.9.1 Methanolfixierung	34
2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung der COS-7- und MDCK-Zellen.....	34
2.9.3 Mikroskopie	35
2.10 Zellfraktionierung und Immunisolation	35

2.10.1 TGN-Temperaturblock und TGN-Release	35
2.10.2 Vesikel-Isolation	36
2.10.3 Co-Immunpräzipitation	37
2.10.4 DRM-Isolation	38
2.11 Metabolische Markierung	40
2.11.1 Oberflächen-Immunpräzipitation auf Transmembranfiltern	40
2.11.2 Oberflächen-Immunpräzipitation auf Kulturschalen	41
2.11.3 Detektion und Auswertung	41
2.13 Biochemische Anwendungen	42
2.12.1 Herstellung der Zelllysate	42
2.12.2 TCA/Aceton Fällung	42
2.12.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.12.4 Western Blot	44
2.12.5 Immunfärbung und Auswertung	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Identifikation von Sec6 an SI-tragenden Vesikeln aus MDCK-SI-YFP-Zellen	45
3.2 Vesikel-Isolation aus MDCK-SI-YFP- und MDCK-SI-Zellen	46
3.2.1 Lokalisation von Sec8 im Saccharose-Stufengradienten	46
3.2.2 Sec8 ist mit SI-tragenden Vesikeln assoziiert	46
3.2.3 Die komplexe Form der SI ist mit Sec8-haltigen Vesikeln assoziiert	47
3.3 Sec8 und SI interagieren nicht direkt miteinander	47
3.4 RNA-Interferenz und Oberflächenimmunpräzipitation mit MDCK-SI-Zellen	49
3.4.1 Spezifische siRNA reduziert endogenes Sec8 in MDCK-SI-Zellen	49
3.4.2 <i>Knockdown</i> von Sec8 hat keinen Effekt auf den Transport der SI	49
3.4.3 <i>Knockdown</i> von Sec8 hat keinen Effekt auf die Sortierung der SI	50
3.5 Mikroskopische Untersuchungen von COS-7- und MDCK-SI-YFP-Zellen	52
3.5.1 SI-YFP kolokalisiert nicht mit Sec6/8 in COS-7-Zellen	52
3.5.2 Rab-4, Rab-8 und Rab-11 kolokalisieren mit Sec6 in COS-7-Zellen	55
3.5.3 SI kolokalisiert mit Sec6 an der lateralen Membran in MDCK-SI-YFP-Zellen	56
3.6 Sec8 ist mit DRMs aus MDCK-SI-Zellen assoziiert	59
4. Diskussion	61
4.1 Die Assoziation von Sec6/8 mit SI-haltigen Vesikeln	62
4.2 Der Einfluss von Sec8 auf den apikalen Transport der SI	63

4.3 Die Lokalisation von Sec6/8 in COS-7-Zellen	64
4.4 Die Lokalisation von Sec6/8 in MDCK-SI-YFP-Zellen	66
4.5 Unterschiedliche Verteilung von Sec6/8 in COS- und polaren MDCK-Zellen	67
4.6 Die Assoziation von Sec8 mit DRMs	69
4.7 Schlussfolgerung	70
4.8 Ausblick	71
5. Zusammenfassung.....	73
5.1 Zusammenfassung	73
5.2 Summary	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Anhang.....	87
7.1 Abkürzungsverzeichnis	87
7.2 Abbildungsverzeichnis	89
7.3 Akademische Lehrer	90
7.4 Danksagung	91

1. Einleitung

Die Plasmamembran, welche die Grenze zwischen tierischer Zelle und Umwelt darstellt, ist keine starre Barriere, sondern unterliegt besonders in sekretorisch aktiven Zellen einem hohen Umsatz. Innerhalb einer Stunde kann die gesamte Plasmamembran bedingt durch stetige Endo- und Exozytosevorgänge (Edidin, 2003) erneuert werden. Dieser Prozess ist umso beeindruckender, wenn man die Membran polarer Epithelzellen betrachtet, die in zwei unterschiedlich aufgebaute Plasmamembranbereiche, dem apikalen und dem basolateralen Bereich, unterteilt wird.

Die Möglichkeit zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer Zellpolarität basiert auf drei wesentlichen Prinzipien. Das erste Prinzip basiert auf dem gerichteten Transport von Proteinen und Lipiden zur basolateralen oder apikalen Plasmamembran, zweitens auf der selektiven Retention dieser Proteine über spezifische Interaktionen und drittens in der Prävention der Durchmischung dieser unterschiedlichen Membranbereiche.

Zur Gewährleistung dieser Prinzipien bedarf es einer komplexen Maschinerie aus unterschiedlichen Protein- und Lipidklassen und deren reguliertem Zusammenwirken.

1.1 Die Epithelzelle

Epithelzellen stellen in ihren verschiedenen morphologischen Formen die Grenze zwischen dem Organismus und der Umwelt her. Dabei dienen sie dem Schutz vor Pathogenen, schützen bedingt vor mechanischen und chemischen Irritationen und verhindern die Austrocknung des Organismus. Weiterhin sind sie unabdingbar bei der selektiven Aufnahme von Nährstoffen (Dünndarmepithel), der Entgiftung des Organismus (Leberepithelzellen, Nierenepithelzellen) und der Synthese lebenswichtiger Bestandteile. Als Beispiel sei hier die hochprismatische Epithelzelle des Dünndarmepithels aufgeführt. Diese Epithelien stellen die Grenze zwischen dem Darmlumen (Umwelt) und dem Organismus her. Die dem Lumen zugewandte Seite nennt man apikale Plasmamembran, als basolaterale Plasmamembran wird die Membran zu den Nachbarepithelzellen (lateral) und zur Basalmembran (baso) bezeichnet (siehe Abbildung 1.1).

Dabei unterscheiden sich die apikale und die basolaterale Plasmamembran in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung voneinander (van Meer und Simons, 1982). Die apikale Membran beherbergt z.B. die Enzyme, wie die Saccharase-Isomaltase (SI) und die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH), die für die Nährstoffprozessierung benötigt werden. Andererseits beherbergt die basolaterale Membran z.B. die Natrium-Kalium-ATPase (Fujita *et al.*, 1971), die für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase essentiell ist. Um eine Barriere gegenüber der Umwelt zu gewährleisten und eine Vermischung der apikalen und basolateralen Plasmamembran mit ihren unterschiedlichen Komponenten zu verhindern, bilden die Zellen untereinander eine Diffusionsbarriere, die sogenannten *Tight Junctions* (TJs) aus.

Tight Junctions besitzen zwei wesentliche Aufgaben. Erstens dienen sie der Ausbildung einer Barriere und verhindern die Durchmischung von apikalen und basolateralen Membrankomponenten (van Meer und Simons, 1986). Zweitens haben sie eine selektive Kanalfunktion, bedingt durch die Claudine (Van Itallie und Anderson, 2006), die es erlaubt, selektiv Ionen aus der Umwelt aufzunehmen. Zwischen zwei benachbarten Zellen werden die *Tight Junctions* durch die Interaktion der extrazellulären Domänen von Occludin und Claudin gebildet (Hartsock und Nelson, 2008). Grenzen drei Zellen an einem Punkt zusammen, scheint hierfür ein erst kürzlich identifiziertes Transmembranprotein namens Tricellulin eine Verzahnung zu bilden (Ikenouchi *et al.*, 2005). Die TJs stellen dabei keine starre Struktur dar, insbesondere Occludin scheint innerhalb der TJs von *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK)-Zellen hochdynamisch zu sein (Shen *et al.*, 2008). Die zytoplasmatische Seite der TJs ist mit einem Konglomerat (*Tight Junction Plaque*) an Proteinen verbunden, die für die richtige Ausbildung der TJs und für die Verbindung zum Aktinzytoskelett, sowie für die Zelldifferenzierung und Proliferation notwendig sind (Guillemont *et al.*, 2008).

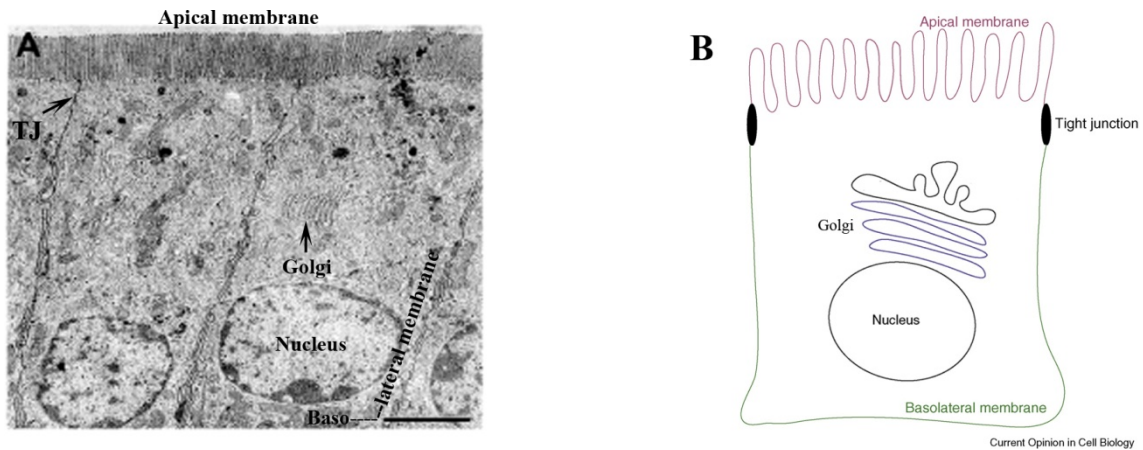


Abbildung 1.1 Die Epithelzelle

A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Maus-Enterozyten. Deutlich zu erkennen sind die basal liegenden Zellkerne und der Bürstensaum der apikalen Membran. Markiert (Pfeil) ist die *Tight Junction* (TJ) und der Golgi Apparat. Die basale Membran ist nicht abgebildet (andeutungsweise beschriftet). Größenbalken: 2 μm

(modifiziert nach: Delacour *et al.*, 2008)

B) Stark vereinfachtes Modell einer Epithelzelle. Die TJs trennen die apikale und basolaterale Membran und verhindern eine Durchmischung ihrer Membrankomponenten.

(modifiziert nach: Fölsch, 2008)

1.2 Polarer Proteintransport

Im Jahr 2006 erschien eine Veröffentlichung, in der beschrieben wurde, wie viele Proteine am Aufbau eines Vesikels beteiligt sind (siehe Abbildung 1.2). Es konnten über 400 Proteine identifiziert werden, die permanent oder transient mit einem Vesikel assoziiert sind (Takamori *et al.*, 2006). Ein Großteil dieser Proteine sind verschiedene SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*)-Proteine, die für die Verschmelzung des Vesikels mit der Zielmembran benötigt werden sowie verschiedene Rab (*Ras like in brain*)-GTPasen, die auf den Vesikel-Transport unter anderem regulierend wirken. Um

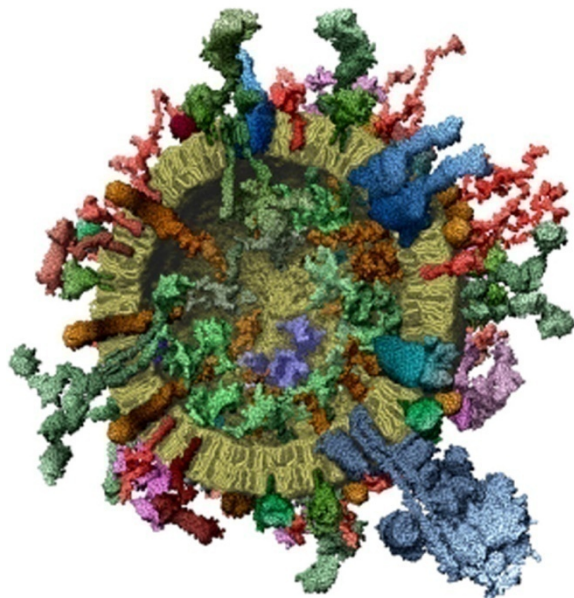


Abbildung 1.2 Modell eines synaptischen Vesikels

Die Hälfte eines synaptischen Vesikels mit Blick auf die luminale Seite. Mit der Lipid-Doppelschicht (grün) sind verschiedenste Proteine assoziiert (Takamori *et al.*, 2006).

Um

die Fracht eines Vesikels richtig auszuwählen, werden verschiedene Sortiersignale benötigt. Diese Signale müssen in der Lage sein, basolaterale und apikale Fracht voneinander zu trennen und die Proteine hinzuzufügen, die auf dem Weg vom Ausgangskompartiment zum Zielkompartiment benötigt werden.

1.2.1 Basolateraler Transport in Epithelzellen

Anfangs ist man davon ausgegangen, dass Transportprozesse zur basolateralen Membran und die Verschmelzung der Transportvesikel mit der Plasmamembran durch Zufall geschieht (Simons und Wandering-Ness, 1990). Vor über 20 Jahren gab es erste Hinweise, dass sich in der zytoplasmatischen Domäne des polymeren Immunglobulin Rezeptors (pIgRs) eine Sortierinformation in Form einer bestimmten Aminosäure (AS)-Sequenz befindet, die entscheidend für den basolateralen Transport in MDCK-Zellen ist (Mostov *et al.*, 1986). Fünf Jahre später konnte diese Entdeckung der zytosolischen Signalsequenz im pIgR konkretisiert werden (Casanova *et al.*, 1991) und auch in anderen basolateralen Proteinen konnten zytosolische Signalsequenzen identifiziert werden (Hunziker *et al.*, 1991). Übertrug man diese Sequenzen auf apikal sortierte Proteine, wie z.B. der plazentaren alkalischen Phosphatase (PLAP), dem Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR}) oder dem Hämagglutinin (HA), wurden sie gemäß der neu enthaltenen Information nach basolateral sortiert.

Heute sind verschiedene Sortiersignale bekannt, die auf dem Tyrosinmotiv YXXΦ (Y=Tyrosin, X=jede proteinogene AS, Φ=hydrophobe AS), dem Dileucinmotiv [D/E]XXXL[L/I] (D=Aspartat, E=Glutamat, L=Leucin, I=Isoleucin) oder einem einzelnen Leucinmotiv beruhen (Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005; Wehrle-Haller und Imhof, 2001). Diese Aminosäuresequenzen werden spezifisch von im Zytosol lokalisierten Adapterproteinen (APs) erkannt und gebunden (Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005). Am besten charakterisiert sind die AP-Komplexe 1-4. Es handelt sich um Heterotetramere, die aus zwei großen Untereinheiten, einer mittleren Untereinheit und einer kleinen Untereinheit bestehen. Sie sind in der Lage, die zytoplasmatischen AS-Sequenzen zu erkennen und zu binden (Fölsch, 2008).

Haben die AP-Komplexe an die zytoplasmatische AS-Sequenz gebunden, sind sie in der Lage, eine weitere Klasse von Proteinen, die sog. *Coat*-Proteine, wie zum Beispiel Clathrin (gilt nicht für AP-4) zu binden. Von AP-1 gibt es zwei Subtypen, AP-1A und AP-1B, die zu 80% identisch sind. Sie unterscheiden sich in ihrer mittleren μ -Untereinheit,

die entsprechend $\mu 1A$ oder $\mu 1B$ genannt wird. Die $\mu 1B$ -Untereinheit wird nur in Epithelzellen exprimiert, hingegen wird $\mu 1A$ ubiquitär exprimiert (Ohno *et al.*, 1999, Fölsch *et al.*, 1999). AP-1B scheint besonders eine Rolle im basolateralen Transport von Proteinen über endosomale Kompartimente zu spielen (Fölsch *et al.*, 2003, Ang *et al.*, 2004, Cancino *et al.*, 2007).

Neben diesen „klassischen“ Adapterproteinen wurden in den letzten Jahren noch weitere solcher Proteine entdeckt, wie z.B. die GGA (*Golgi-localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor binding*)-Proteine (Bonifacino, 2004).

Clathrin ist das bekannteste *Coat*-Protein, welches durch die AP-Komplexe 1-3 rekrutiert wird. Einzelne Clathrin-Monomere (Triskelions) sind in der Lage zu oligomerisieren und sich käfigartig an einem Membranabschnitt anzuordnen. Dieser Vorgang treibt die Vesikelbildung aus einem Spenderkompartiment voran und führt unter der Beteiligung weiterer Proteine, wie z.B. Dynamin, zum Abschnüren eines Vesikels. Erst kürzlich konnte experimentell gezeigt werden, dass Clathrin eine entscheidende Rolle im basolateralen Transport spielt (Deborde *et al.*, 2008).

Diese ganze Maschinerie aus Signalsequenz, Bindung von AP-Komplexen, Rekrutierung von Clathrin, Abschnürung von Vesikeln mit der selektionierten Fracht und letztendlich die Verschmelzung mit der basolateralen Zielmembran über spezifische SNARE-Komplexe, funktioniert äußerst effizient. Als Beispiel sei hier der Transferrin Rezeptor (TfR) erwähnt, der mit einer Effizienz von über 90% in polaren MDCK-Zellen nach basolateral sortiert und wiederverwertet wird (Thompson *et al.*, 2007).

Die basolateralen Sortiersignale sind gegenüber den apikalen Sortiersignalen in den meisten Fällen dominant (Fölsch, 2008), jedoch gibt es Ausnahmen (Jacob *et al.*, 1999; Ihrke *et al.*, 2001).

1.2.2 Apikaler Transport in Epithelzellen

Das Prinzip, wie oben beschrieben, scheint beim apikalen Transport nicht zu existieren oder wurde bisher nicht identifiziert. Bis heute sind keine AP-Komplexe oder *Coat*-Proteine bekannt, die im Transport von apikal lokalisierten oder sezernierten Proteinen involviert sind. Ebenso scheint es für die gefundenen apikalen Sortiersignale (GPI-Anker, N- und O-Glykane, Transmembrandomänen, zytoplasmatische Domänen) kein festes Muster zu geben, welches auf alle apikal sezernierten Proteine zutrifft oder

anwendbar ist (Delacour und Jacob, 2006). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass apikal sezernierte Proteine verschiedene Transportwege, je nach Typ der Epithelzelle, nehmen. In Hepatozyten erfolgt bevorzugt der transzytotische Weg über die basolaterale Membran nach apikal, hingegen erfolgt in Nierenepithelzellen eher ein direkter Weg nach apikal (Mostov *et al.*, 2000). Übergeordnet unterscheidet man im apikalen Transport zwischen einem *Lipid Raft*-abhängigen und einem *Lipid Raft*-unabhängigen Transportweg, in denen die verschiedenen apikalen Sortiersignale eine beeinflussende Rolle spielen.

Proteine, die über keine eigene Membrandomäne verfügen, können über einen sog. Glykosylphosphatidylinositol (**GPI**)-Anker mit der Membran verbunden werden. Die Gruppe um Rodriguez-Boulan konnte zeigen, dass sich GPI-verankerte Proteine (GPI-APs) apikal befinden (Lisanti *et al.*, 1988) und dass der GPI-Anker als apikales Sortiersignal dienen kann (Lisanti *et al.*, 1989). Brown und Rose konnten 1992 zeigen, dass sich GPI-APs in sog. Detergenz resistenten Membranen (DRMs) befinden und basolaterale Proteine von diesen speziellen Membranen abwesend sind (Brown und Rose, 1992). Der GPI-Anker als apikales Sortiersignal führt aber nicht zwingend zur apikalen Sortierung des gebundenen Proteins, da GPI-APs in bestimmten Epithelzellen auch basolateral vorkommen (Mostov *et al.*, 2000). Der Zusatz eines weiteren apikalen Sortiersignals zu diesen basolateral lokalisierten GPI-APs, kann zum apikalen Transport führen. Dies konnte bei dem GPI-verankerten Ratten Wachstumshormon (GPI-rGH) gezeigt werden, nachdem in GPI-rGH eine N-Glykosylierungsstelle eingefügt wurde (Benting *et al.*, 1999).

Direkt nach der Translokation sekretorischer Glykoproteine in das Lumen vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), werden bestimmte Asparagin (N)-Reste, durch ein im ER lokalisiertes Enzym, mit einer vorgefertigten Einheit aus mehreren Zuckermolekülen verbunden und später in den einzelnen Golgi-Zisternen modifiziert. Dieser Vorgang wird als **N-Glykosylierung** bezeichnet und ist die häufigste Glykosylierungsform. Vermutungen, dass N-Glykane einen Einfluss auf den apikalen Transport von Proteinen haben könnten, kamen aus mit Tunicamycin behandelten MDCK-Zellen, welche in der Fähigkeit der N-Glykosylierung von Proteinen gehemmt sind. In diesen Zellen kommt es zu einer Fehlsortierung des physiologisch apikal sezernierten Glykoproteins-80 (gp80) an beide Plasmamembrandomänen (Delacour

und Jacob, 2006). Der erste Beweis, dass posttranslationale Modifikationen in Form von N-Glykanen einen direkten Einfluss auf den apikalen Transport haben, konnte die Arbeitsgruppe von Kai Simons zeigen. Sie verwendeten das nicht glykosylierte Ratten Wachstumshormons (rGH) und fügten eine N-Glykosylierungsstelle ein. Die N-glykosylierte Mutante wurde nur über die apikale Membran sezerniert (Scheiffele *et al.*, 1995) und nicht, wie der Wildtyp (WT), über beide Membrandomänen. Verschiedene Proteine benötigen N-Glykane zur apikalen Exozytose (z.B. der Glycin-Transporter-2), andere wiederum nicht (z.B. p75^{NTR}) (Delacour und Jacob, 2006).

Neben der N-Glykosylierung spielt auch die Glykosylierung von bestimmten OH-Gruppen (**O-Glykosylierung**) einiger Aminosäuren eine wichtige Rolle im apikalen Transport mancher Proteine. Anders als bei der N-Glykosylierung, erfolgt die O-Glykosylierung erst im Golgi-Apparat, indem unterschiedliche Zuckermoleküle auf die OH-Gruppen der Aminosäuren Serin und Threonin übertragen werden. Als Beispiel seien hier SI und p75^{NTR} genannt, die eine O-Glykosylierung für den apikalen Transport benötigen (Alfalah *et al.*, 1999; Yeaman *et al.*, 1997).

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung untersuchte die Rolle bestimmter N- und O-Glykane im Transport der *Lipid Raft*-abhängigen Modellproteine GPI-PLAP und GPI-p75^{NTR} in Bezug auf deren Fähigkeit hochmolekulare Proteinkomplexe zu bilden (Catino *et al.*, 2008). Es zeigte sich, dass für die Bildung der Komplexe, die untersuchten N- und O-Glykane nicht benötigt werden. Jedoch führte eine Enzymhemmung im Reaktionsweg der N-Glykosylierung zu einer fehlenden Oligomerisierung und zu einer Fehlsortierung der verwendeten Modellproteine an die basolaterale Plasmamembran. Die Autoren schließen daraus, dass die N-Glykane einen Einfluss auf die richtige Proteinfaltung haben könnten, durch die die spätere Oligomerisierung induziert wird (Catino *et al.*, 2008).

Ein Konzept der apikalen Sortierung ist die Bildung von sog. **Lipid Rafts**. Als *Lipid Rafts* werden spezielle Membranmikrodomänen in Zellmembranen angesehen, die reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind (Simons und Ikonen, 1997). Dagegen bezeichnet man als Detergenz resistente Membranen (DRMs), Cholesterin und Sphingolipid-reiche Membranen, die man nach Extraktion mit einem nicht-ionischen Detergenz, wie z.B. Triton-X-100, erhält. Einfacher ausgedrückt, werden Cholesterin und Sphingolipid reiche Membranen als *Lipid Rafts in vivo* und als DRMs *in vitro* bezeichnet. Ob die

DRMs den *Lipid Rafts in vivo* entsprechen, wird weiterhin kontrovers diskutiert (Helms und Zurzolo, 2004). Ein aktuelles Modell der Plasmamembran umfasst neben der unterschiedlichen Verteilung von Proteinen auch ein Nebeneinander von unterschiedlichen Lipiddomänen. Es wird von zwei Zuständen in biologischen Membranen ausgegangen. Erstens der l_d -Domäne (*liquid disordered*), bestehend aus ungesättigten Glycerolipiden und zweitens der l_o -Domäne (*liquid ordered*) oder *Lipid Raft*-Domäne, welche reich an Cholesterin und Sphingolipiden ist und durch deren Eigenschaften die Membran dichter und geordneter vorliegt (Hancock, 2006). Diese Erkenntnisse stammen alle von Modellmembranen *in vitro*. Das Problem an der Sache ist, dass die l_o -Domäne in intakten Zellen (*in vivo*) noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sie entweder nicht vorhanden sind oder deren Größe unter der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskope (<300 nm) liegen (Shaw, 2006). Durch Modellrechnungen geht man von einer Größe von 5-20 nm aus (ein Membranabschnitt von 5 nm besteht aus 15-20 Lipiden und 4-5 Proteinen), also deutlich unter der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze. Durch Experimente mit Modellmembranen ist bekannt, dass diese l_o -Domänen durch Proteine stabilisiert und deutlich größer werden können (>100 nm) (Hancock, 2006).

Eine Stabilisierung dieser speziellen Domänen könnte durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen innerhalb dieser Domänen erfolgen (Schuck und Simons, 2004). Das setzt voraus, dass Proteine durch laterale Diffusion in Zellmembranen in diese *Raft*-Domänen ein- oder ausgeschlossen werden können. Eingeschlossen werden können zum Beispiel Proteine, wie das HA und die Neuraminidase (NA), die über Transmembrandomänen verfügen, die mit *Lipid Raft*-Domänen interagieren können (Scheiffele *et al.*, 1997; Kundu *et al.*, 1996). Eine andere Möglichkeit besteht in der indirekten Assoziation von Proteinen über einen GPI-Anker mit *Lipid Raft*-Domänen. Hierbei interagiert der Lipid-Schwanz des GPI-Ankers mit den *Lipid Rafts* (Brown und Rose, 1992). Diese alleinige Assoziation ist aber nicht ausreichend, die Proteine in den *Lipid Rafts* müssen untereinander noch vernetzt werden, um größere und stabilere Plattformen zu bilden (Kahya *et al.*, 2005).

Zusammenfassend lässt sich zum *Lipid Raft*-Konzept folgendes festhalten: Proteine verbinden sich zunächst über ihre Transmembrandomänen (Scheiffele *et al.*, 1997; Kundu *et al.*, 1996) oder indirekt über den GPI-Anker (Brown und Rose, 1992) mit sehr

kleinen und instabilen *Lipid Rafts* und stabilisieren diese dadurch. Durch die Verschmelzung kleinerer Domänen entstehen größere und stabilere. Diese werden durch die Clusterung der eingeschlossenen Proteine untereinander oder durch *Lipid Raft* assoziierte Clusterproteine, wie z.B. dem *vesicular integral protein-17* (VIP17) aufrechterhalten (Cheong *et al.*, 1999). Denkbar wäre auch eine direkte Vernetzung der *Raft*-Lipide durch z.B. Galektin-4 (Delacour *et al.*, 2004), dieser Vorgang könnte ebenfalls zur Bildung großer *Raft*-Plattformen beitragen. Entstandene *Lipid Raft*-Plattformen könnten aufgrund der zunehmenden Phasenspannung an der Grenze der I_o -Domäne und I_d -Domäne sogar in der Lage sein, ohne *Coat*-Proteine abzuknospen und Vesikel zu bilden, da dieser Zustand energetisch vorteilhafter wäre (Schuck und Simons, 2004; Hanzal-Bayer und Hancock, 2007). In der Abbildung 1.3 ist die Bildung der *Lipid Raft*-Plattformen graphisch dargestellt.

Nach Modellrechnungen würden Aufteilungen der zuvor entstandenen *Raft*-Plattformen in kleinere *Raft*-Domänen durch Endozytosevorgänge an der apikalen Membran möglich sein und würden einem erneuten Transportzyklus zur Verfügung stehen (Turner *et al.*, 2005). Ein Argument für das *Lipid Raft*-Konzept im apikalen Transport liegt in der Zusammensetzung der apikalen Membran an sich, die reich an Cholesterin und Sphingolipiden ist und durch einen selektiven Transport aufrecht erhalten werden muss (Schuck und Simons, 2004).

Neben den apikalen Proteinen, die mit DRMs assoziiert sind, gibt es eine Reihe von apikalen Proteinen, die nicht mit DRMs assoziieren. Diese Proteine gelangen über einen *Lipid Raft*-unabhängigen Transportweg zur apikalen Membran. Dazu zählen z.B. das intestinale Bürstensaum-Enzym LPH, p75^{NTR} und gp114 (Delacour und Jacob, 2006). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich das Lektin Galektin-3 im Lumen von LPH-, p75^{NTR}- und gp114-tragenden post-Golgi Vesikeln befindet. Galektin-3 bindet an die Zuckerreste der Proteine, wodurch eine Oligomerisierung oder Clusterung der Proteine induziert wird. Eine Verminderung der endogenen Galektin-3 Konzentration in MDCK-Zellen, führt zu einer Fehlsortierung der genannten Proteine an die basolaterale Plasmamembran (Delacour *et al.*, 2006). Fehlen die für die Galektin-3 Bindung verantwortlichen Zuckerketten, bleibt eine Clusterung der Proteine aus und sie werden ebenfalls fehlsortiert (Delacour *et al.*, 2007). Eine Clusterung der Proteine

könnte zu einer Membrankrümmung und schließlich zum Abschnüren eines Vesikels führen (Delacour und Jacob, 2006). In Abbildung 1.3 ist ein Modell des *Lipid Raft*-unabhängigen Transportes graphisch dargestellt.

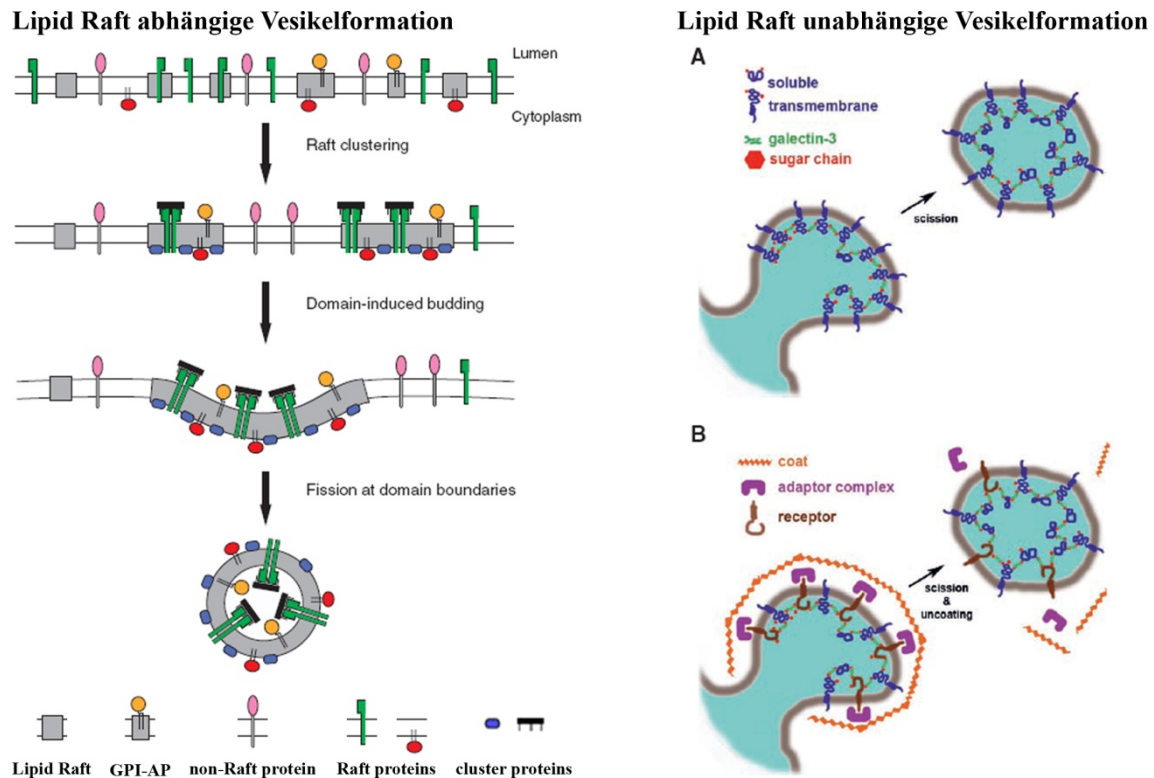


Abbildung 1.3 Modelle zur Sortierung und Vesikelformation im apikalen Transport

Lipid Raft-abhängige Vesikelformation: Proteine besitzen unterschiedliche Affinitäten zu *Lipid Rafts*. GPI-verankerte Proteine besitzen indirekt eine hohe Affinität, da der Lipid-Schwanz des GPI-Ankers mit *Lipid Rafts* interagiert. *Raft*-Proteine können über ihre Transmembrandomäne direkt mit *Lipid Rafts* interagieren und werden in die *Raft*-Domänen durch laterale Diffusion eingeschlossen. Nicht-*Raft*-Proteine sind nicht in der Lage mit diesen Domänen zu interagieren und werden dadurch ausgeschlossen. Durch Verschmelzen kleinerer *Raft*-Domänen und Stabilisierung durch Cluster-Proteine, entstehen *Lipid Raft*-Plattformen. Diese können durch eine zunehmende Phasenspannung zwischen den unterschiedlichen Lipiddomänen abschnüren und apikale Transportvesikel bilden (Schuck und Simons, 2004).

Lipid Raft-unabhängige Vesikelformation: A) Galectin-3 bindet von der luminalen Seite an Glykoproteine und führt zur Oligomerisierung der Proteine. Dieser Vorgang führt zu einer Membrankrümmung und resultiert im Abschnüren eines apikalen Transportvesikels. B) Galectin-3 bindet an Glykoproteine und rekrutiert Adapter Protein (AP)-Komplexe. APs rekrutieren Coat-Proteine und führen zum Abschnüren eines apikalen Transportvesikels. (A und B: Delacour und Jacob, 2006)

1.3 Trans-Golgi Netzwerk und endosomale Kompartimente

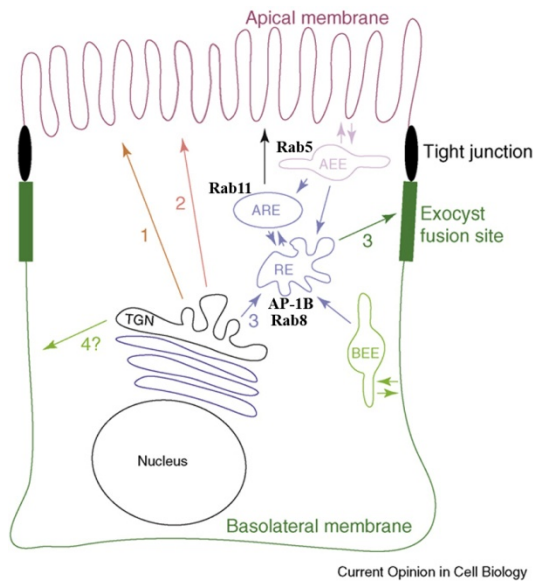


Abbildung 1.4 TGN und Endosomen

- 1) *Lipid Raft*-abhängiger apikaler Transport
- 2) *Lipid Raft*-unabhängiger apikaler Transport
- 3) indirekter basolateraler Transport über das Recycling Endosome (RE)
- 4) direkter basolateraler Transport

Der apikale Transport ist auch über verschiedene Endosomen möglich. (AEE - *Apical Early Endosome*, ARE - *Apical Recycling Endosome*, RE - *Recycling Endosome*, BEE - *Basolaterale Early Endosome*, TGN - *trans-Golgi Network*) (modifiziert nach: Fölsch, 2008)

Kompartimente stellen Reaktionsräume innerhalb der Zelle dar. Diese Reaktionsräume unterscheiden sich in ihrer Lipidzusammensetzung der umgebenen Membran, ihrem luminalen pH-Wert und durch assoziierte Proteine. Aufrechterhalten wird diese Diversität durch kleine GTPasen der Rab-Familie und der Arf (*ADP-ribosylation factor*)-Familie, sowie durch deren Effektorproteine (Behnia und Munro, 2005). Neben dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat, die vor allem der Synthese und der Modifikation von Proteinen dienen, spielen für den Proteintransport auch sog. endosomale Kompartimente oder Endosomen eine wichtige Rolle. Je nach Zelltyp unterscheidet man mehrere Endosomen, die überwiegend über die Rab-GTPasen definiert werden

(schematisch dargestellt in Abbildung 1.4).

Klassische Sekretionsproteine sammeln sich nach Durchlaufen des ERs, des *ER-Golgi intermediate compartments* (ERGICs) und des Golgi-Apparates zunächst im sog. *trans-Golgi-Netzwerk* (TGN). Das *trans-Golgi Netzwerk* gilt als möglicher Ort, in dem apikale und basolaterale Proteine entsprechend ihrer Transportwege sortiert werden.

Die Arbeitsgruppe um Kai Simons konnte vor einigen Jahren zeigen, dass die Aufteilung von basolateralen und apikalen Proteinen im TGN geschieht (Keller *et al.*, 2001). Jedoch scheinen nicht alle Sortiervorgänge hier zu erfolgen. Jacob und Naim konnten zeigen, dass sich LPH und SI aus dem TGN zunächst in einem gemeinsamen Vesikel abknospen. Die Trennung von der *Lipid Raft*-assoziierten SI und der nicht *Lipid Raft*-assoziierten LPH erfolgt später in einem post-Golgi Kompartiment (Jacob und Naim, 2001). Diese Beobachtungen sind durchaus vereinbar: zunächst erfolgt die

Auftrennung von basolateraler und apikaler Fracht, in post-Golgi Vesikeln dann die spätere Auftrennung in den *Lipid Raft*-abhängigen und *Lipid Raft*-unabhängigen apikalen Transportweg. Bewerkstelligt werden könnte dies durch eine Galektin-3 vermittelte Clusterung und Separierung der *Lipid Raft*-unabhängigen Glykoproteine, was schließlich zur Bildung eines *Lipid Raft*-unabhängigen Transportvesikels führt (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007).

Für einige basolaterale Proteine ist schon länger bekannt, dass sie auf dem Weg vom TGN zur Plasmamembran (PM) das *Recycling Endosome* (RE) durchqueren (Futter *et al.*, 1995; Ang *et al.*, 2004). Zwei Veröffentlichungen konnten kürzlich zeigen, dass dafür AP-1B, ein in Epithelzellen spezifisch exprimiertes Adapterprotein (Ohno *et al.*, 1999; Fölsch *et al.*, 1999), richtungsweisend ist (Cancino *et al.*, 2007; Gravotta *et al.*, 2007). Kommt es durch spezifische Antikörper zu einer Blockade von AP-1B in *Fischer Rat Thyroid* (FRT)-Zellen, führt dies zu einem Transportstopp der Proteine *vesicular stomatitis virus-glycoprotein* (VSV-G) und *transferrin receptor* (TfR) auf Höhe des REs nach Verlassen des TGNs. Hingegen war der biosynthetische Weg des *low density lipoproteine receptors* (LDLR) vom TGN zur PM nicht beeinträchtigt. Das Recycling vom RE zurück an die basolaterale PM nach erfolgter Endozytose (PM → RE → PM), war bei allen Proteinen beeinträchtigt, da die Wiederverwertung der Proteine über das RE läuft (Cancino *et al.*, 2007). Für TfR konnte in unpolaren MDCK-Zellen zunächst ein AP-1B abhängiger Transport über das RE an die PM gezeigt werden. Hingegen konnte in polaren MDCK-Zellen ein AP-1B unabhängiger Transport vom TGN an die PM gezeigt werden. Das Recycling des TfRs war in AP-1B defizienten MDCK-Zellen zu jedem Zeitpunkt gestört (Gravotta *et al.*, 2007). Fields und Kollegen diskutieren dabei einen möglichen direkten AP-4 abhängigen Weg vom TGN zur Plasmamembran des TfRs in polaren MDCK-Zellen und ein AP-1B abhängiges Recycling über das RE (Fields *et al.*, 2007).

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die apikalen Proteine SI und LPH auf dem Weg zur Oberfläche ebenfalls endosomale Kompartimente durchqueren (Cramm-Behrens *et al.*, 2008).

Einen interessanten Aspekt liefert eine Veröffentlichung, die zeigt, dass das RE in polaren Epithelzellen verschiedene Regionen oder Domänen ausbildet, die zwischen basolateralen und apikalen Proteinen im Prozess des Recyclings unterscheidet. Diese

Domänen finden sich nicht in unpolaren Zellen und bilden sich erst mit der Polarität aus (Thompson *et al.*, 2007).

1.4 Aspekte des Zytoskeletts im polaren Proteintransport

Nach Abknospen der Vesikel aus dem TGN müssen sie zu der entsprechenden Zielmembran transportiert werden. Dabei spielen für den apikalen Transport die Mikrotubuli eine entscheidende Rolle. Interessant, auch in Bezug auf zytoplasmatisch gelegene apikale Sortiersignalen ist, dass Rhodopsin über seine zytoplasmatische Domäne von der Leichtkette Tctex-1 (*t complexed testis expressed-1*) des Motorproteins Dynein erkannt wird und den Transport über Mikrotubuli an die apikale Membran gewährleistet (Tai *et al.*, 1999).

Epithelzellen besitzen die Fähigkeit, während der Ausbildung ihrer Polarität, die Orientierung ihrer Mikrotubuli zu reorganisieren. Während in unpolaren Zellen das Minus-Ende der Mikrotubuli im Zentrosom nahe dem Zellkern verankert ist, richten sich die Mikrotubuli in polaren Epithelzellen entlang der apiko-basalen Achse mit dem Minus-Ende nach apikal aus (Müsch, 2004). Daran scheint die Kinase EMK1 entscheidend beteiligt zu sein (Cohen *et al.*, 2004). Umso verblüffender ist, dass der apikale Transport von p75^{NTR} in polaren MDCK-Zellen von KIF5B, ein zum Plus-Ende gerichtetes Motorprotein, abhängig ist. Dies ist dadurch zu erklären, dass es neben den Mikrotubuli, die mit dem Minus-Ende zur apikalen Membran ausgerichtet sind, auch Mikrotubuli vorkommen, bei denen das Plus-Ende zur apikalen Membran ausgerichtet ist (Jaulin *et al.*, 2007).

Die Auswahl der Motorproteine scheint auch vom Polarisationsgrad der Epithelzellen abzuhängen. KIF5B ist für den Transport von p75^{NTR} in polaren MDCK-Zellen zuständig, nicht jedoch in unpolaren MDCK-Zellen. In unpolaren MDCK-Zellen konnte KIF1A für den p75^{NTR}-Transport identifiziert werden (Vortrag Geri Kreitzer, ITTC Meeting 2008, Marburg).

Das Aktinzytoskelett bildet ein dichtes Netzwerk unter der apikalen und basolateralen Membran. Jacob und Kollegen konnten eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts im Transport der SI, nicht aber für die LPH, zur apikalen Membran nachweisen. Dabei geschieht in MDCK-Zellen der Transport zunächst an Mikrotubulifilamenten und

wechselt peripher auf Aktinfilamente (Jacob *et al.*, 2003). Der Transport könnte durch Myosin-Ia gewährleistet und durch die α -Kinase1 reguliert werden (Heine *et al.*, 2005). Am Transport von basolateralen Proteinen ist das Aktinzytoskelett beteiligt. Ein Hauptregulator des Aktinzytoskeletts ist Cdc42. Cdc42-Mutanten führen zu einem verzögerten Transport von basolateralen Proteinen an die Plasmamembran, nicht aber von apikalen Proteinen (Müsch *et al.*, 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass für den AP-1B abhängigen basolateralen Transport Myosin-VI, ein zum Minus-Ende gerichtetes Motorprotein, verantwortlich ist. Dominant-negative Mutanten von Myosin-VI führten zu einer Fehlsortierung von VSV-G und der Chimäre CD8-LDL (*cluster of differentiation 8 – low density lipoprotein*) an die apikale Membran. Myosin-VI hat also neben einer möglichen Transportfunktion auch eine Sortierfunktion (Au *et al.*, 2007).

1.5 Der Exocyst-Komplex

Damit ein Vesikel mit seiner Zielmembran verschmelzen kann, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Erstens muss das Vesikel an die Zielmembran gebunden werden ohne direkt mit ihr zu verschmelzen. Im zweiten Schritt erfolgt die Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Zielmembran über die Interaktion von *vesicle* (v)-SNARE und *target* (t)-SNARE Proteinen (Bonifacino und Glick, 2004).

Eine Gruppe der Bindungskomplexe stellen Multiproteinkomplexe dar. Als Beispiel seien hier der *conserved oligomeric Golgi* (COG)-Komplex, der *transport protein particle* (TRAPP)-Komplex und der *Golgi associated retrograde protein* (GARP)-Komplex genannt, die vor allem auf Höhe des Golgi-Apparates dem anterograden und retrograden Transport dienen (Sztul und Lupashin, 2006; Oka und Krieger, 2005). Der Exocyst-Komplex stellt einen peripheren Bindungskomplex an der Plasmamembran und an endosomalen Kompartimenten dar.

Beim Exocyst-Komplex, auch Sec6/8-Komplex genannt, handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der aus acht Proteinen (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p, Exo84p) besteht. Die Bezeichnung „Exocyst“ leitet sich aus seiner essentiellen Funktion in der Exozytose ab (TerBush *et al.*, 1996). Sec steht für „Secretory“ und bezeichnet Gene, die Proteine exprimieren, die für die Exozytose notwendig sind, deren Proteinäquivalent (p) man damals aber noch nicht kannte

(Novick *et al.*, 1980). Im weiteren Verlauf wird auf den Zusatz „p“ verzichtet und mit „Sec“ und „Exo“ wird immer das Protein bezeichnet.

Entdeckt und charakterisiert wurde der Exocyst-Komplex zunächst in *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) von der Arbeitsgruppe um Peter Novick (Bowser *et al.*, 1992; TerBush *et al.*, 1995, Guo *et al.*, 1999b). In *S.cerevisiae* ist der Exocyst-Komplex für das Wachstum (Knospung) der Tochterzelle aus der Mutterzelle essentiell (TerBush *et al.*, 1996). Während der Knospung markiert dieser Komplex Membranbereiche in der Tochterzelle, an die ankommende Vesikel binden und deren Verschmelzung mit der Plasmamembran zum Auswachsen der Tochterzelle führt (siehe Abbildung 1.5 A). Mutationen von Komponenten des Exocyst-Komplexes führen zur Akkumulation von *post*-Golgi Vesikeln im Zytoplasma und zum Wachstumsarrest der Tochterzelle (TerBush *et al.*, 1996). Der Komplex besteht aus einem membranständigen Teil und einem mobilen, vesikelgebundenen Anteil (Boyd *et al.*, 2004). Der vesikelgebundene Anteil interagiert mit der Rab-GTPase Sec4 über die Untereinheit Sec15 (Guo *et al.*, 1999a). Es können dabei alle Untereinheiten des Exocyst-Komplexes, außer Sec3, mit einem Vesikel assoziiert sein (Boyd *et al.*, 2004). Keine der Untereinheiten hat eine Transmembrandomäne. Die Membranbindung wird über die Interaktion von Sec3 und Exo70 mit Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) in der Plasmamembran vermittelt (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Dabei stellt Sec3 eine Landmarke an der Plasmamembran dar und kann unabhängig vom Aktinzytoskelett an die Membran rekrutiert werden (Finger *et al.*, 1998; Zajac *et al.*, 2005). Reguliert wird der Exocyst-Komplex in *S.cerevisiae* über kleine GTPasen. Sec3 interagiert mit Cdc42 (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008) und Rho1 (Guo *et al.*, 2001). Exo70 interagiert mit Rho3 (Adamo *et al.*, 1999).

In polaren MDCK-Zellen befindet sich der Exocyst-Komplex überwiegend als stabiler, membrangebundener Anteil an der lateralen Membran, in unmittelbarer Nähe zu den *Tight Junctions* (Grindstaff *et al.*, 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass während der Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen, sich der Anteil des Exocysts von einem zytoplasmatischen Pool zu einem membranständigen Pool verschiebt (siehe Abbildung 1.5 B). Eine eventuelle Assoziation mit E-Cadherin und Nectin2α wird während der Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen diskutiert (Yeaman *et al.*, 2004). Wie in *S.cerevisiae* wird die Membranbindung über die Interaktion von Exo70 mit PI(4,5)P₂

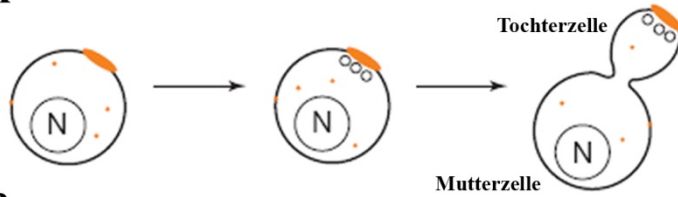
oder das in tierischen Zellen vorkommende und an der basolateralen Membran lokalisierte Phosphatidyl-Inositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) vermittelt (Gassama-Diagne *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Die Position des Exocyst-Komplexes an der lateralen Membran in polaren MDCK-Zellen, liegt nahe der Fusionstelle für basolaterale Vesikel (Kreitzer *et al.*, 2003). Der Exocyst-Komplex beeinflusst die Sekretion des basolateralen Proteins LDLR in MDCK-Zellen (Grindstaff *et al.*, 1998) und ist zusammen mit Syntaxin-4 notwendig für den Transport des basolateral lokalisierten Proteins *aquaporin-3* (AQP3) (Nejsum und Nelson, 2007). Darüberhinaus konnte eine Beteiligung des Exocyst-Komplexes im basolateralen Recycling von Transferrin und im apikalen Recycling von Immunglobulin A (IgA) gezeigt werden. An der Transzytose des plgR-IgA von der basolateralen zur apikalen Plasmamembran ist der Exocyst-Komplex ebenfalls beteiligt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Untereinheiten des Exocyst-Komplexes an verschiedenen Endosomen in polaren MDCK-Zellen vorkommen (Oztan *et al.*, 2007). Lipschutz und Kollegen diskutieren eine mögliche Rolle des Exocysts in der post-translationellen Modifizierung von Proteinen. Sie konnten eine Assoziation von Sec10 mit Sec61β, einem Bestandteil des Translocons im ER, nachweisen. Eine Überexpression von Sec10 führt zu einer gesteigerten Expression von basolateralen Proteinen bei gleichbleibendem mRNA (*messenger ribonucleic acid*)-Level (Lipschutz *et al.*, 2003). Desweiteren scheint der Komplex auch mit dem primären Zilium in MDCK-Zellen assoziiert zu sein (Roger *et al.*, 2004).

In Neuronen (siehe Abbildung 1.5 C) findet sich eine hohe Expressionsrate der Proteine des Exocyst-Komplexes (Ting *et al.*, 1995). Der Exocyst ist in Nervenzellen essentiell für das Heranwachsen des Axons, vergleichbar dem Heranwachsen der Tochterzelle in *S.cerevisiae* (Hazuka *et al.*, 1999; Vega und Hsu, 2001). In undifferenzierten Phäochromozytom (PC12)-Zellen findet sich der Komplex an einem perinukleären Kompartiment und markiert mit zunehmender Differenzierung den Wachstumskegel des heranwachsenden Axon. Dabei sind die Untereinheiten Sec8 und Exo70 mit Mikrotubuli assoziiert. Mutationen in den Untereinheiten Sec8 und Sec10 verhindern die Differenzierung der PC12-Zellen (Vega und Hsu, 2001). Sec8 ist am Transport des NMDA (*N-methyl-D-aspartate*)-Rezeptors und des AMPA (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid*)-Rezeptors in die Synapse beteiligt (Sans *et al.*, 2003; Gerges *et al.*, 2006). Exo70 markiert die synaptische Zielmembran und

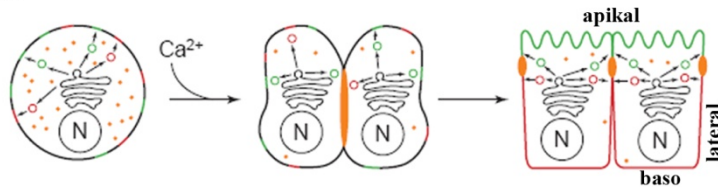
Mutationen in der Untereinheit Exo70 führen zu einer Akkumulation von Sec8-haltigen Vesikeln in der Nähe der synaptischen Membran (Gerges *et al.*, 2006).

Die Regulation des Komplexes in höheren Organismen geschieht wie in *S.cerevisiae* über kleine GTPasen. In Adipozyten reguliert TC10, ein Protein der Rho-Familie, die Untereinheit Exo70 und führt nach Insulin-Stimulation zum Transport des Glukose Transporters-4 (GLUT4) an die Plasmamembran (Inoue *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2008). Die GTPasen RalA und RalB, welche nicht in *S.cerevisiae* exprimiert werden, interagieren ausschließlich mit den Untereinheiten Sec5 und Exo84 (Moskalenko *et al.*, 2002; Moskalenko *et al.*, 2003). Exo84 kann sich in einem Komplex zusammen mit Sec15 und Sec10 an einem Vesikel befinden und Sec5 zusammen mit Sec6 an der Zielmembran (siehe Abbildung 1.6). Die Vereinigung beider Komplexe wird über die Ral-GTPasen reguliert (Moskalenko *et al.*, 2003). RalA hat eine sehr viel höhere Affinität zu Sec5 und Exo84 als RalB. Eine Überexpression von RalA führt in MDCK-Zellen zu einem erhöhten Transport von E-Cadherin an die basolaterale Plasmamembran. Der apikale Transport von gp135 ist dagegen nicht verändert. Kein Effekt zeigte sich bei einer Überexpression von RalB (Shipitsin und Feig, 2004). RalB scheint hingegen eine Rolle in der induzierten Polarität zu haben. Während der Migration von *Normal Rat Kidney* (NRK)-Zellen kommt es zu einer vermehrten Komplexbildung von RalB mit Sec5. Eine Hemmung von RalB führt zu einer Verlangsamung der Migration. Eine Hemmung von RalA zeigte keinen Effekt (Rosse *et al.*, 2006). Weiterhin bestätigen sich die zuvor gewonnenen Daten über die Rolle des Exocyst-Komplexes im gerichteten Transport und der Ausbildung einer Zellpolarität in den verschiedenen Zelltypen mit Blick auf die Ral-GTPasen. RalA reguliert den GLUT4-Transport nach Insulin-Stimulation (Chen *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2008). RalA und RalB regulieren die Differenzierung von Neuronen (Lalli und Hall, 2005).

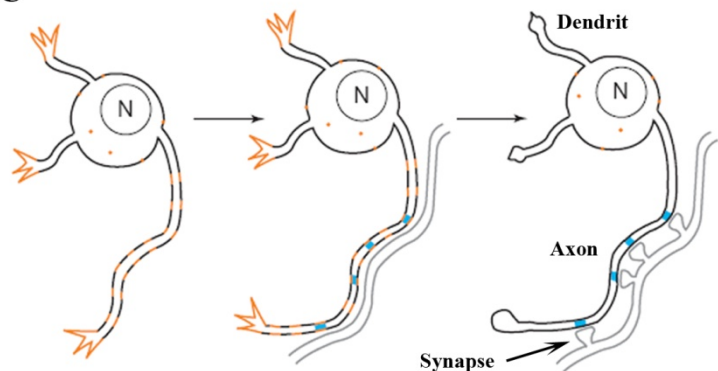
A



B



C


Abbildung 1.5 Lokalisation des Exocyst-Komplexes
A) Hefezellen:

Der Exocyst Komplex markiert die Spitze der wachsenden Tochterzelle für ankommende Vesikel. (orange: Exocyst)

B) MDCK-Zellen:

Der Exocyst Komplex verlagert sich während der Ausbildung der Polarität von einem zytosolischen Pool zu einem membranständigen Pool auf Höhe der *Tight Junctions*.

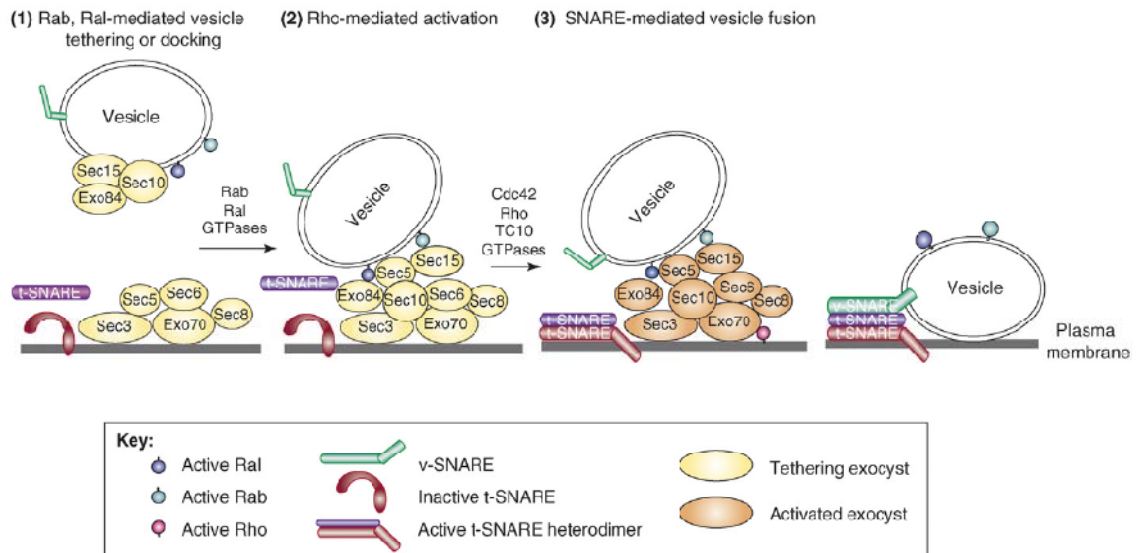
(grün: apikale Proteine; rot: baso-laterale Proteine)

C) Nervenzellen:

Der Exocyst-Komplex markiert den Wachstumskegel in den Nervenfasern und führt zum Auswachsen des Axons und zur Formierung präsynaptischer Kontakte.

(blau: Vesikelansammlung)

(modifiziert nach: Hsu *et al.*, 1999)



TRENDS in Cell Biology

Abbildung 1.6 Modell der Vesikelbindung

Exocyst-Untereinheiten können unabhängig voneinander mit Vesikeln und der Plasmamembran verbunden sein (dargestellt ist nur ein mögliches Beispiel). Kleine GTPasen regulieren deren Lokalisation. Die Vereinigung der Untereinheiten kann über Ral-GTPasen reguliert werden und die feste Bindung ermöglicht die Annäherung der SNARE-Proteine und Verschmelzung des Vesikels mit der Plasmamembran (Wu *et al.*, 2008).

1.6 Die Saccharase – Isomaltase als Modellprotein

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das aus dem Dünndarm stammende Enzym SI als ein apikales Modellprotein verwendet. Die SI ist ein Typ-II Transmembranprotein, mit einem zytoplasmatisch gelegenen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus. Extrazellulär befinden sich die beiden Enzym-Untereinheiten Isomaltase und Saccharase. Dieser Teil des Proteins macht mehr als 90% des Gesamtproteins aus. Insgesamt besteht das Protein aus 5 Domänen: einer kleinen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne, einer Stab-Domäne und den zwei Enzymdomänen (Hunziker *et al.*, 1986).

Während der Biosynthese ändert sich das Glykosylierungsmuster der SI. Im ER wird die SI an bestimmten Asparagin-Resten mannosereich glykosyliert (SI_h). Diese Zuckerketten werden im Golgi-Apparat modifiziert, ebenso erfolgt hier die O-Glykosylierung der SI. Nach Durchlaufen des Golgi-Apparates spricht man von der komplex-glykosylierten Form der SI (SI_c) (Naim *et al.*, 1988).

Bisher veröffentlichte Arbeiten konnten zeigen, dass der apikale Transport der SI über den *Lipid Raft*-abhängigen Transportweg verläuft und für den apikalen Transport die O-Glykosylierung der Stab-Domäne notwendig ist (Alfalah *et al.*, 1999, Jacob *et al.*, 2000). Desweiteren ist der apikale Transport an Mikrotubuli und Aktinfilamente gebunden (Jacob *et al.*, 2003) und von Annexin-II abhängig (Jacob *et al.*, 2004).

1.7 Aufgabenstellung

Nach der Identifizierung von Sec6 an SI-haltigen Vesikeln, stellte sich die Frage, ob die Exocyst-Untereinheit Sec6 einen Einfluss auf den apikalen Transport der SI hat? Desweiteren sollte herausgefunden werden, wo die Interaktion von Sec6 mit SI-tragenden Vesikeln stattfindet. Der Exocyst-Komplex befindet sich in polaren MDCK-Zellen hauptsächlich an der lateralen Membran, in unmittelbarer Nähe zu den TJs. Es stellte sich somit auch die Frage, ob die SI einen möglichen indirekten Weg zur apikalen Plasmamembran zunächst über die laterale Membran nimmt.

Erkenntnisse über den indirekten apikalen Transport, stammen vor allem aus Hepatozyten (Bartles *et al.*, 1987). Polishchuk und Kollegen stellten auch für GPI-APs die Vermutung auf, dass diese in MDCK-Zellen über einen indirekten Weg zur apikalen Membran gelangen (Polishchuk *et al.*, 2004). Diese Beobachtung wurde jedoch durch

eine andere Veröffentlichung widerlegt (Paladino *et al.*, 2006). In *colon adenocarcinoma-2* (Caco-2)-Zellen wurde ein indirekter Weg der SI zur apikalen Plasmamembran schon früher diskutiert (Le Bivic *et al.*, 1990). Die Aufgabe bestand darin, durch biochemische Versuche und mikroskopische Untersuchungen, die Assoziation der Exocyst-Untereinheit Sec6 mit SI-haltigen Vesikeln weiter zu verifizieren. Eine mögliche Bedeutung der Exocyst-Untereinheit Sec6 auf den Transport der SI, sollte durch Experimente mit spezifischer *short interfering* (si)RNA gegen Sec6 in MDCK-Zellen überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Inkubatoren: Inkubatoren für die Zellkultur; Heraeus

Sterilbank: Sterilbank für die Zellkultur HERA safe; Kendro, Hanau

Zentrifugen: Ultrazentrifuge Sorvall CombiPlus; DuPont, Wilmington, USA

Rotor: TH 641

Ultrazentrifuge Optima LE-80K; Beckman Coulter

Rotor: SW 41

Tischzentrifuge Biofuge pico; Heraeus

Tischzentrifuge Hettich universal; Günther Wilke OHG, Hamburg

Kühlzentrifuge Biofuge fresco; Heraeus

Kühlzentrifuge Allegra X-22R; Beckman Coulter

Rotoren: C1015, FX301.5

Heizgeräte: Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg

Heizblock UBD; Grant

Mikroskope: Konfokales Laser Scanning Mikroskop (KLSM) TCS SP2; Leica Microsystems

Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10; Carl Zeiss AG

Detektionsgeräte:

Chemilux-Imager; Intas, Göttingen

Phosphoimager Fujifilm FLA-3000; Raytest

Schüttler: Horizontalschüttler KS10; Edmund Bühler, Tübingen

Überkopfschüttler REAX 2; Heidolph

Horizontalschwenker STR8; StuartScientific, UK

SDS-Gelelektrophorese Geräte:

SDS-Gelapparatur miniVE; Hoefer
SDS-Gelapparatur Hoefer SE-260; Amersham Biosciences
Trans-Blot SD Cell; BioRad, USA
Electrophoresis Power Supply EPS601 und EPS301; Amersham Biosciences
Gel-Gießvorrichtung Dual Gel Caster; Amersham Bioscience
Glasplatten, Abstandshalter und Kämme; Biorad

Sonstige Geräte:

Peristaltische Pumpe Minipuls3; Abimed/Gilson, Frankreich
Peristaltische Pumpe Perpex
Pipettenset; Gilson
Vakuumpumpe für Zellkultur; Welch
Absaugpumpe KNF Las; Laboport
Feinwaage APX-1502; Denver Instruments
pH – Meter Modell pH 510; Eutech Instruments, Singapur
Vortex-Genie 2; Scientific-Industries
Magnetrührer MSH basic Yellow line; Kobe
Ultraschallgerät Labsonic 1510; B.Braun, Melsungen
Reinstwasser – System Clear; SG
Reinstwasseranlage Elix 5 UV; Millipore
Spülmaschinen Miele Professional G7883 und G7783

Software:

Microsoft Office 2007
Adobe Photoshop Version 8
Raytest BASReader Version 3.14
Gel-Pro Analyzer Version 4.5
LCS Lite Version 2.6
Sigma Plot

Häufige Gebrauchsgegenstände:

Folgende Produkte wurden von der Firma Sarstedt bezogen: Reaktionsgefäße (RGs) (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml), Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl), Zellkulturschalen (10 cm), Zellkulturplatten (6-well, 24-well), Kryoröhrchen (2 ml). Transmembran-Filter für die Zellkultur wurden von Becton-Dickinson (Falcon, 24-well Format) und Greiner bio-one (Thin Cert, 6-well Format) bezogen. Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear, 14 * 89 mm) wurden von Beckman Coulter bezogen.

2.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Alle aufgeführten Chemikalien sind mindestens von p.a.-Qualität.

Produkt	Bezugsquelle
Aceton	Roth; Karlsruhe
Acrylamid – Rotiphorese-Gel30	Roth; Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva; Heidelberg
Bromphenolblau	Roth; Karlsruhe
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Roth; Karlsruhe
Chloroquin	Serva; Heidelberg
Cycloheximid	Sigma-Aldrich; Steinheim
DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran	Amersham Biosciences
DMEM – Low Glucose	PAA Laboratories; Österreich
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)-High Glucose	PAA Laboratories; Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva; Heidelberg
DTT (Dithiothreitol)	Gerbu Biotechnik; Gaiberg
ECL – Western blotting detection reagent	Apbiotech; UK
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth; Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	Roth; Karlsruhe
Essigsäure	Merck; Darmstadt
Ethanol	Merck; Darmstadt
FKS (Fetales Kälberserum)	Biowest
G418 (Gentamicin)	Biochrom AG
Glycerin	Roth; Karlsruhe
Glycin	Roth; Karlsruhe
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansolfonsäure))	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Roth; Karlsruhe
K ₂ HPO ₄ (Di-kaliumhydrogenphosphat)	Merck; Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck; Darmstadt
L – Glutamin (10x)	PAA Laboratories; Österreich
Lipofectamin™2000	Invitrogen
Luminol	Fluka Chemie; Schweiz

Magermilchpulver	Töpfer
Magnesiumacetat	Merck; Darmstadt
MEM (Minimal Essential Medium)	PAA Laboratories; Österreich
MEM ohne Methionin	Biowest
Methanol	Fluka Chemie; Schweiz
Mowiol 4-88	Calbiochem
Na ₂ HPO ₄ (Di-natriumhydrogenphosphat)	VWR International
Natriumchlorid (NaCl)	Roth; Karlsruhe
Nitrozellulose Transfer Membran PROTRAN	Whatman
NP40	Calbiochem
P-Coumaric Säure	Fluka Chemie; Schweiz
Penicillin/Streptomycin (10X)	PAA Laboratories; Österreich
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck; Darmstadt
Proteaseinhibitoren: Antipain, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor	Roche Diagnostic
Protein-A-Sepharose (PAS) Fast Flow	Amersham Biotech
Proteinmarker PageRuler™Plus Prestained	Fermentas; Kanada
RNAi gegen Sec8 und Luciferase	Genordia; Schweden
S35-Methionin (10 µCi/µl)	Perkin Elmer life sciences
Saccharose D (+)	Roth; Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 32%	Merck; Darmstadt
Saponin	Roth; Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich; Steinheim
TCA (Trichloressigsäure)	Roth; Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth; Karlsruhe
Triethanolamin	Merck; Darmstadt
TRIS (Tris(hydroxyl) – aminomethan)	Roth; Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich; Steinheim
Trypsin / EDTA (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA)	PAA Laboratories; Österreich
Wasserstoffperoxid	Merck; Darmstadt
Ziegenserum	Dako

Tabelle 2.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Weitere, hier nicht aufgeführte, aber allgemein gebräuchliche Chemikalien sind mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka oder Serva bezogen.

2.3 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

PBS (*phosphate buffered saline*):

140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 6,5 mM Na₂PO₄, 1,5 mM K₂HPO₄; pH 7,4

PBS + NP40:

PBS versetzt mit 0,1% (v/v) NP40

Proteinase-Inhibitoren (PI) – Mix:

Lösung 1: PMSF 3,4 mg/ml (in DMSO)

Lösung 2 (für 20 ml in PBS): 20 µl Pepstatin 1mg/ml (in DMSO), 20 µl Antipain 1mg/200µl (in DMSO), 20 µl Leupeptin 1mg/200µl (in PBS), 20 µl Aprotinin 1mg/ml (in PBS), 20 µl Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor 25mg/500µl (in PBS).

Vor Gebrauch wurden 25 µl der Lösung 1 mit 500 µl der Lösung 2 gemischt.

Magnesiumacetat-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM Mg-Acetat; pH 7,4 (eingestellt mit HCl)

HBT-Puffer:

10 mM Triethanolamin, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose; pH 7,4 (eingestellt mit Essigsäure)

HEPES-Puffer:

10 mM HEPES, 2 mM EGTA; pH 7,4

TNE-Puffer:

25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5mM EDTA; pH 7,4 (eingestellt mit HCl)

Saccharose-Lösungen für die Vesikel-Isolation:

2 M Saccharose, 1,3 M Saccharose, 1,16 M Saccharose, 0,8 M Saccharose angesetzt mit Magnesiumacetat Puffer.

Saccharose-Lösungen für die DRM-Isolation:

1. Lösungen für die Isolation der Membranfraktion: 1,2 M Saccharose, 0,8 M Saccharose, 0,25 M Saccharose angesetzt mit HEPES-Puffer
2. Lösungen für die Isolation der DRM Fraktion: 2,4 M Saccharose, 1,1 M Saccharose, 0,15 M Saccharose angesetzt mit HEPES-Puffer

SDS-Probenpuffer (3x):

150 mM Tris, 6% (w/v) SDS; 30% (v/v) Glycerin, 15% (v/v) 1 M DTT, 0,02% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8 (eingestellt mit HCl)

SDS-Laufpuffer (1x):

25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

Transfer-Puffer für Western Blot:

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,04% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol

Blocklösung für Western Blot:

5% (w/v) Magermilchpulver in PBS

Lysispuffer für die Co-IP:

25 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 0,5% (v/v) NP40; pH 7,5 (eingestellt mit HCl)

Lysispuffer für die Oberflächen-IP:

25 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,5% (w/v) SDS, 0,5% (v/v) Triton-X-100; pH 8,0 (eingestellt mit HCl)

Lysispuffer für Zelllysate:

100 mM Tris, 3% (w/v) SDS; pH 8,0 (eingestellt mit HCl)

Gel-Fixierlösung:

20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Waschpuffer I für Oberflächen-IP:

0,5% (v/v) Triton-X-100, 0,05% (w/v) SDS

Waschpuffer II für Oberflächen-IP:

500 mM NaCl, 125 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,5% (v/v) Triton-X-100; pH8 (eingestellt mit HCl)

ECL (Elektrochemilumineszenz)-Lösung:

Luminol-Lösung: 0,44 g Luminol in 10 ml DMSO lösen, zu 1 ml Aliquote bei -20°C aufbewahren

P-Coumaric Säure: 0,15 g in 10 ml DMSO lösen, zu 440 µl Aliquote bei -20°C aufbewahren

Lösung 1 (100 ml Ansatz): 10 ml 1 M Tris (pH 8,5), 1 ml Luminol-Lösung, 440 µl P-Coumaric Säure

Lösung 2 (100 ml Ansatz): 10 ml 1 M Tris (pH 8,5), 60 µl Wasserstoffperoxid

Vor Gebrauch Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 mischen.

2.4 Immunologische Reagenzien

Alle Antikörper wurden in PBS verdünnt.

Primärantikörper	Bezug	IB	IF	IP
mAb Sec8 (Klon 14G1)	Stressgen	1 : 1.000	1 : 100	
mAb Sec8 (8S-2E12)	S. Hsu (Rutgers Universität, Piscataway, USA)		1 : 2	pur
mAb Sec6 (Klon 9H5)	Stressgen		1 : 100	
mAb SI-WT (HBB 3/705)	H.P. Hauri (Biozentrum, Basel)	1 : 500		
mAb SI-WT (HBB 219)				1 : 20
mAb SI-WT (HBB 691)				1 : 20
pAb β -Catenin	Sigma-Aldrich		1 : 200	
pAb GFP (full-length)	BD Biosciences			1 : 10
mAb Actin (Ab-5)	BD Biosciences	1 : 1.000		
mAb Caveolin-1 (C060)	BD Biosciences	1 : 500		
Sekundärantikörper				
GaM - HRP - IgG	Bio Rad	1 : 2.000		
GaM Alexa-546	Invitrogen		1 : 250	
GaRb Alexa-633	Invitrogen		1 : 250	

Tabelle 2.2 Immunologische Reagenzien (mAb: *monoclonal antibody*, pAb: *polyclonal antibody*, WT: Wildtyp, GaM: *goat anti mouse*, GaRb: *goat anti rabbit*, GFP: *green fluorescent protein*, HRP: *horseradish peroxidase*, IgG: Immunglobulin G, IB: Immunoblot; IF: Immunfluoreszenz; IP: Immunpräzipitation)

2.5 Konstrukte

Die verwendeten Konstrukte wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe angefertigt. Folgende Konstrukte wurden verwendet: pRab4-ECFP-C1, pRab8-ECFP-C1, pRab11-ECFP-C3 (Cramm-Behrens *et al.*, 2008) und SI-EYFP-C1 (Jacob und Naim, 2001).

2.6 RNA-Interferenz

Die Synthese eines Proteins kann man gezielt unterdrücken, in dem die für die Synthese benötigte mRNA zur Degradation gebracht wird. Bei diesem Vorgang spricht man von einer Verminderung oder *Knockdown* des betroffenen Proteins. Dafür erstellt man Doppelstrang RNA (dsRNA) mit einer Länge von ca. 20 Basenpaaren, deren Stränge komplementär zu Teilen der mRNA des zu vermindernten Proteins (Ziel-mRNA) sind. In die Zellen eingebrachte dsRNA wird von Proteinkomplexen im Zytoplasma erkannt und in Einzelstränge (siRNA) gespalten. Diese lagern sich an die Ziel-mRNA an und führen zu deren Degradation (Rana, 2007). Um die Effizienz des *Knockdowns* zu steigern, wurden zwei siRNA-Ansätze gegen Sec8 (A und B) verwendet.

Zur Kontrolle wurde ein siRNA-Ansatz gegen das Enzym Luciferase (Luc) verwendet, ein in MDCK-Zellen nicht exprimiertes Protein. Die Transfektion der siRNA erfolgte mit Lipofectamin™2000 (siehe Punkt 2.8.2).

siRNA-Sec8 (Hund):

A) 5`-GCGGCUGGUGGGAAAUACAUU-`3 / 3`-UUCGCCGACCACCCUUUAUGU-`5

B) 5`-GUUGUGGAUUGAAGGAAUUUU-`3 / 5`-AAUUCCUCAAUCCACAACUU-`3

siRNA-Luc:

5`-CGUACGCGGAAUACUUCGATT-3` / 5`-UCGAAGUAUUCCGCGUACGTT-3`

2.7 Zellkultur

2.7.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturschalen (Durchmesser: 10 cm) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Den Zellkulturmedien wurde L-Glutamin mit einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt, da diese Aminosäure nicht wie andere stabil ist. Als Kontaminationsschutz wurde Penicillin (100 U/ml Medium) und Streptomycin (100 µg/ml Medium) zugegeben. Weitere Zusätze und zellspezifische Medien sind in der Tabelle 2.3 aufgeführt. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte im Abstand von 2-3 Tagen.

2.7.2 Zelllinien

Für die Experimente wurden zwei unterschiedliche Zelllinien verwendet, COS-7-Zellen und MDCK-II-Zellen.

COS (CV-1, Origin, SV40)-Zellen wurden 1981 etabliert (Gluzman, 1981). Als Ausgangszelllinie dienten die Nierenzellen CV-1 aus der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die mit einer mutierten Form der *Simian Virus 40* (SV40) Desoxyribonukleinsäure (DNS) stabil transformiert wurden. Dabei entstanden drei Klone, bezeichnet als COS-1, COS-3 und COS-7. Alle drei Klone exprimieren das SV40 spezifische große T-Antigen, welches einen starken Effekt auf die Zellproliferation und die Proteinexpression hat (Sullivan und Pipas, 2002).

COS-Zellen sind Fibroblasten-artige Zellen. Sie wachsen adhärent und in einer Einzelschicht nebeneinander. Morphologisch sind sie sehr flach, weshalb sie zur mikroskopischen Untersuchung von Transportvorgängen sehr gut geeignet sind, da sich der vesikuläre Transport in COS-Zellen überwiegend in einer Ebene abspielt.

MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*)-Zellen wurden 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby aus der Niere eines Hundes (Cocker Spaniel) isoliert. Es wurden zwei Stämme etabliert. Aus einer frühen Passage der Stamm I und aus einer späteren Passage der Stamm II. Zwischen diesen beiden Stämmen gibt es einige Unterschiede. Stamm I weist im Vergleich zu Stamm II (MDCK-II) sehr dichte Epithelverbindungen auf. Desweiteren gibt es morphologische Unterschiede, wie z.B. das Fehlen des primären Ziliums im Stamm I (Hansson *et al.*, 1986). Im Folgenden werden die verwendeten MDCK-II-Zellen nur noch als MDCK-Zellen bezeichnet. MDCK-Zellen sind Epithelzellen, die ein einreihiges, hochprismatisches Zylinderepithel bilden. Das MDCK-Zellsystem ist besonders geeignet, um polare Transportvorgänge zu untersuchen.

Es wurden zwei transformierte MDCK-Zelllinien verwendet, bei denen das Modellprotein Saccharase-Isomaltase (SI) stabil transfiziert ist. Bei der MDCK-SI-YFP Zelllinie, ist die SI mit einem gelb fluoreszierenden Protein (YFP: *yellow fluorescent protein*) markiert. Die YFP-Markierung befindet sich dabei am N-Terminus der SI und liegt intrazellulär. Die MDCK-SI-Zelllinie exprimiert den Wildtyp der SI. Zur Aufrechterhaltung der Expression enthielt das verwendete Kulturmedium zusätzlich G418 (500 µg/ml Medium) als Selektionsmarker. Die MDCK-SI-YFP-Zelllinie wurde für die Vesikel-Isolation von SI-tragenden Vesikeln und für die mikroskopischen Untersuchungen verwendet. Für die Oberflächen-Immunpräzipitation (IP), die Co-IP, die Vesikel-IP gegen Sec8 und die DRM-Isolation, wurde die MDCK-SI-Zelllinie verwendet.

Zelllinie	Bezug/Referenz	Zellmedium
COS-7	ECACC/Sigma	DMEM-Low Glucose + 10% (v/v) FKS
MDCK II	ECACC/Sigma	MEM + 5% (v/v) FKS
MDCK-SI-YFP	Jacob und Naim, 2001	MEM + 5% (v/v) FKS + 0,5 mg/ml G418
MDCK-SI	Jacob <i>et al.</i> , 2003	

Tabelle 2.3 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.7.3 Passagieren der Zellen

Zur Zellpassage wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit ca. 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) auf die Zellen gegeben und bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen von der Zellkulturschale gelöst hatten. Durch die Zugabe von 8 ml frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die gelösten Zellen wurden im gewünschten Verhältnis auf die neuen Kulturschalen oder auf die Transmembranfilter verteilt.

2.7.4 Einfrieren und Auftauen

Die Zellen können in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Die durch Trypsin gelösten Zellen einer dicht bewachsenen Kulturschale, wurden in ein 15 ml RG überführt und für 5 min bei 800 Rotationen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium (80% des Zelltyp-spezifischen Mediums mit Zusätzen, 10% (v/v) FKS, 10% (v/v) DMSO) aufgenommen und in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde in mehrere Lagen Papier (Whatman 3MM) gewickelt und für einen Tag in der -80°C Gefriertruhe belassen. Am nächsten Tag wurden sie in den Stickstoff-Tank überführt.

Bei Bedarf wurden die Zellen dem Stickstoff-Tank entnommen und die aufgetaute Zellsuspension mit 10 ml frischem Medium vermischt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 800 rpm) wurden die Zellen mit frischem Medium auf zwei Kulturschalen verteilt.

2.8 Transfektions-Methoden

2.8.1 DEAE-Dextran Transfektion von COS-7-Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurde eine Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) mit dicht gewachsenen (konfluenten) COS-7-Zellen im Verhältnis 1:4 in neue Zellkulturschalen mit 4-5 sterilen Deckgläschen (rund, Menzel-Gläser) verteilt. Am Tag der Transfektion wurden ca. 10 µg Plasmid-DNS und 9 µl DEAE-Dextran-Lösung in 1,5 ml DMEM-Low Glucose Medium ohne Zusätze pipettiert, geschüttelt und für 15 min bei RT inkubiert. Kurz vor der Zugabe des Plasmid-Dextran Gemisches, wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und die 1,5 ml Transfektionslösung in die Kulturschalen

mit den Deckgläschen pipettiert. Der Transfektionsansatz verblieb für 1,5 h auf den Zellen. Um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen und einer Austrocknung vorzubeugen, wurden die Schalen ca. alle 15 min geschwenkt. Danach wurde das Gemisch abgesaugt und die COS-7-Zellen mit 10 ml frischem DMEM-Medium (mit allen Zusätzen) versorgt, in das 10 µl Chloroquin (60 µg/ml Medium) zugegeben wurde. Chloroquin führt zu einer Anhebung des pH-Wertes in den Endosomen und Lysosomen und verhindert dadurch die schnelle Degradation der aufgenommenen DNS. Nach 2 h erfolgte ein erneuter Wechsel des Mediums. COS-7-Zellen, die mit SI-YFP, Rab4-CFP oder Rab11-CFP transfiziert waren, erhielten nach 24 h einen weiteren Wechsel des Kulturmediums und wurden nach 48 h fixiert. Zellen, die mit Rab8-CFP transfiziert waren, wurden bereits nach 24 h fixiert, da eine Überexpression von Rab8 zu starken zellmorphologischen Veränderungen führt (Peränen *et al.*, 1996).

2.8.2 Lipofectamin™ 2000 Transfektion von MDCK-Zellen

Für die Transfektion der MDCK-SI-Zellen mit siRNA gegen Sec8, wurde Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) verwendet. Lipofectamin enthält positiv geladene Lipide, die mit der negativ geladenen RNA Komplexe bilden. Diese Lipid-RNA-Komplexe werden durch Endozytose von den Zellen aufgenommen. Die Transfektion der siRNA erfolgte in MDCK-SI-Zellen, die auf Zellkulturfiltern und in Kulturschalen wuchsen.

2.8.2.1 Transfektion von MDCK-SI-Zellen auf Transmembranfiltern

MDCK-SI-Zellen wurden auf 6-*well*-Filtern, die sich in entsprechenden Kulturplatten befanden, einen Tag vor der Transfektion mit der siRNA im Verhältnis 1:60 von einer konfluenten MDCK-SI Kulturschale ausgesät. Die Zellen wuchsen in einem MEM-Medium, welches keine Antibiotika enthielt. Für die siRNA-Transfektion der MDCK-SI-Zellen wurde ein Protokoll der Firma Invitrogen (Form-No. 18057N) verwendet.

Es wurden 5 µl Lipofectamin in 250 µl MEM-Medium (ohne Zusätze) und 15 µl (300 pmol) des siRNA-Sec8 Ansatzes oder des siRNA-Luc Ansatzes in 250 µl MEM-Medium (ohne Zusätze) angesetzt. Die Inkubationszeit betrug 5 min. Danach wurden der Lipofectamin-Ansatz und der siRNA-Ansatz zusammengegeben, gut geschüttelt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur (RT) zur Komplexbildung inkubiert. Es wurden jeweils zwei Ansätze pro Filter vorbereitet: einen für die apikale Seite und einen für die

basolaterale Seite (siehe Abbildung 2.1). Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz zur apikalen und basolateralen Seite pipettiert und für 5 h – 8 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl MEM-Medium (mit 5% (v/v) FKS) zur apikalen Seite in den Filter und 750 µl zur basolateralen Seite in die Kulturplatte gegeben, um eine Austrocknung und einen Nährstoffmangel zu vermeiden. Um eine ausreichende Verminderung (*Knockdown*) des endogenen Sec8 zu erreichen, wurden die Zellen insgesamt 3x mit siRNA-Sec8 nach der zuvor beschriebenen Methode transfiziert. Am 5.Tag erfolgte die Oberflächen-Immunpräzipitation (siehe Punkt 2.11.1).

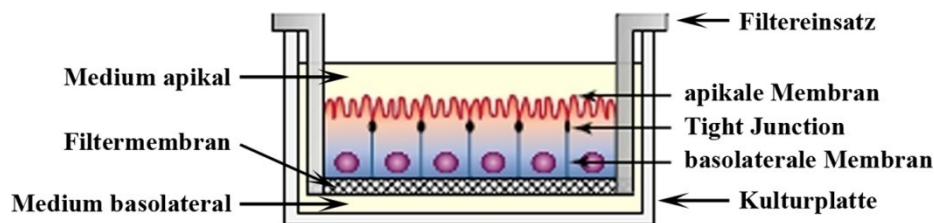


Abbildung 2.1 Modell eines Transmembranfilters

MDCK-Zellen wachsen auf einer porösen Filtermembran, die durchlässig für Nährstoffe und Antikörper ist. Dieses System ermöglicht es, zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran zu unterscheiden. Getrennt werden die beiden Membran-Domänen durch die *Tight Junctions* (Zegers *et al.*, 2003).

2.8.2.2 Transfektion von MDCK-SI-Zellen in Kulturschalen

Für die siRNA-Transfektion von MDCK-SI-Zellen in Kulturschalen wurden MDCK-SI-Zellen einen Tag vor der Transfektion im Verhältnis 1:5 von einer konfluenten Kulturschale ausgesät. Analog zu den Filterexperimenten, wuchsen die Zellen in einem MEM-Medium ohne Antibiotikazusatz. Am Tag der Transfektion erfolgte die Vorbereitung des Transfektionsgemisches. Es wurden 20 µl Lipofectamin in 1,5 ml MEM-Medium (ohne Zusätze) und 15 µl siRNA-Sec8-Ansatz oder siRNA-Luc-Ansatz in 1,5 ml MEM-Medium (ohne Zusätze) angesetzt. Die Inkubationszeiten waren identisch, wie unter Punkt 2.8.2.1 beschrieben. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben und für 5 h – 8 h bei 37°C belassen, bevor die Zugabe von 3 ml MEM-Medium (versetzt mit 5% (v/v) FKS) erfolgte. Die Zellen wurden insgesamt 3x nachdem beschriebenen Protokoll transfiziert. Am 5.Tag erfolgte die Oberflächen-Immunpräzipitation (siehe Punkt 2.11.2).

Der Test für die Effizienz der Wirksamkeit von siRNA-Sec8 in MDCK-SI-Zellen wurde ebenfalls mit dem beschriebenen Protokoll durchgeführt. Am 5.Tag wurden die Zellen

lysiert und die Proteinbestandteile mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Analyse des endogenen Sec8 erfolgte mittels des Western Blots (siehe Punkt 2.12.4).

2.9 Fluoreszenzmikroskopische Anwendungen

2.9.1 Methanolfixierung

Die Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz erfolgte mit Methanol. MDCK- oder COS-7-Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit -20°C Methanol beschichtet und bei -20°C für 10 min fixiert. MDCK-Zellen, die auf Filtern wuchsen, wurden sowohl von der apikalen als auch basolateralen Seite fixiert. Methanol fixiert und permeabilisiert die Zellen. Eine zusätzliche Permeabilisierung für die spätere Antikörperinkubation ist daher nicht notwendig. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen und mit 0,2% BSA / 1% Ziegenserum in PBS für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit einer Proteinlösung dient dem Sättigen und Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen, an denen die später zugegeben Antikörper möglicherweise unspezifisch binden könnten. Danach wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen.

2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung der COS-7- und MDCK-Zellen

Alle verwendeten Antikörper wurden in PBS verdünnt. In Tabelle 2.2 sind die verwendeten Antikörperkonzentrationen aufgelistet. Mit Hilfe einer Feinpinzette wurden die mit COS-7-Zellen bewachsenen Deckgläschen aus der Kulturschale herausgeholt und auf ein Stück Parafilm (Firma Roth) gelegt. Das Stück Parafilm befand sich dabei auf einem mit Wasser gedrängten Schaumstoffstück, welches in einer Plastikbox lag. Danach wurden jeweils 40 µl des Antikörperansatzes auf die Deckgläschen pipettiert.

Wurden die mit MDCK-SI-YFP bewachsenen Filter verwendet, so verblieben die Filter zunächst in der 24-well Platte. Das PBS der apikalen Seite wurde abgesaugt und jeweils 30 µl des Antikörperansatzes auf die apikale Seite pipettiert. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte für 2 h bei RT. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurden die Plastikbox und die 24-well-Platte mit einem feuchten Zellstofftuch abgedeckt. Vor der Zugabe der Sekundärantikörper, erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS.

Die Sekundärantikörper verblieben für 1 h bei RT auf den Zellen. Danach wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne erfolgte die Inkubation des Farbstoffs Hoechst (1:1000 in PBS) für 10 min. Der Farbstoff Hoechst interkaliert in die DNS, wodurch die Kerne in der Fluoreszenzmikroskopie farblich sichtbar werden. Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS. Die Filtermembran mit den MDCK-SI-YFP-Zellen und die Deckgläschen mit den COS-7-Zellen wurden in Mowiol, welches sich auf dem Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) befand, gebettet. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei RT.

2.9.3 Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen der angefertigten Präparate erfolgte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop TCS SP-2 von Leica. Es wurde ein 40x Öl-Planapochromat Objektiv (Leica Microsystems, Wetzlar) verwendet. Die Aufnahmen der Fluoreszenzsignale erfolgten im sequenziellen Modus, um Überlagerungen von Anregungs- und Emissionssignalen der verwendeten Fluorochrome zu vermeiden. Bearbeitet wurden die erstellten Bilder mit der Leica Software LCS Lite und Adobe Photoshop.

2.10 Zellfraktionierung und Immunisolation

2.10.1 TGN-Temperaturblock und TGN-Release

Der Transport von sekretorischen Proteinen lässt sich bei 20°C spezifisch im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) blockieren (Matlin und Simons, 1983). Hierbei kommt es zu einer Akkumulation der Proteine im TGN. Inkubiert man die Zellen anschließend bei 37°C, können die Proteine das TGN verlassen (TGN-Release).

Die Zellen wurden für 4 h bei 20°C in Anwesenheit von 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert. Cycloheximid hemmt die Synthese neuer Proteine. Zur Wiederaufnahme der Sekretion aus dem TGN, inkubierten die Zellen anschließend für 20 min bei 37°C. Diese Bedingungen gleichten denen, die zur Identifikation von Sec6 an SI-tragenden Vesikeln geführt hatten.

2.10.2 Vesikel-Isolation

MDCK-SI-YFP- und MDCK-SI-Zellen wuchsen 4-5 Tage in Kulturschalen. Für einen Gradienten wurden fünf konfluente Kulturschalen verwendet. Nach dem TGN-Temperaturblock für 4 h bei 20°C und der Inkubation für 20 min bei 37°C, wurden die Platten sofort auf Eis gestellt und einmal mit ca. 5 ml kaltem HBT-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und in 1 ml HBT-Puffer (versetzt mit 20 µl PI-Mix) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch 15-faches auf- und abziehen mit einer 26G-Kanüle (BD Biosciences) mechanisch aufgeschlossen. Das Zell-Homogenat wurde für 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen vorbereiteten, diskontinuierlichen Saccharose-Stufengradienten (1 ml 2 M Saccharose, 4 ml 1,3 M Saccharose, 3,5 ml 1,6 M Saccharose, 2 ml 0,8 M Saccharose-Lösung) gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 2,5 h bei 38.000 rpm in einem SW41-Rotor (Beckman) oder einem TH641-Rotor (Sorvall). Die Zentrifugation diente der Auftrennung der Zellorganellen.

Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten mit Hilfe einer Glaskapillare und einer peristaltischen Pumpe vom Boden des Gradienten (unten: Fraktion 1; oben: Fraktion 12) zu je 1 ml abgenommen und die gewünschten Fraktionen in 1,5 ml RGs überführt. Für die spezifische Vesikel-Isolation der SI-YFP-tragenden Vesikel, wurden die TGN positiven Fraktionen 8-10 verwendet. Die gewonnenen Fraktionen 8-10 wurden jeweils mit 20 µl PI-Mix versetzt. Ein *Preclearing* erfolgte mit jeweils 50 µl Protein-A-Sepharose (PAS) für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Dieser Vorgang dient der Konzentrationsverminderung von Proteinen, die unspezifisch an PAS binden. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml RG überführt. Die Immunpräzipitation von SI-YFP-tragenden Vesikeln wurden jeweils mit 3 µl pAb anti-GFP (1:10 in PBS) durchgeführt. Bei der Immunpräzipitation von Sec8-tragenden Vesikeln aus MDCK-SI-Zellen wurden jeweils 50 µl des mAb anti-Sec8 Antikörpers (8S-2E12) verwendet. Den Kontrollen wurde kein Antikörper hinzugegeben. Die Antikörper-Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei 4°C. Danach wurden den Proben jeweils 50 µl PAS zugesetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler geschwenkt.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 1 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift erfolgte insgesamt 6x mit 1 ml HBT-Puffer und

die Zentrifugationsschritte erfolgten für 1 min bei 2.000 rpm. Nach der Zentrifugation wurden die jeweils drei zueinander gehörenden Proben (Fraktionen 8-10 eines Ansatzes) in ein neues RG gepoolt. Durch die Verwendung eines neuen RGs wurden unspezifisch gebundene Proteine an der Wand des zuvor verwendeten RGs ausgeschlossen.

Die gewaschenen Proben wurden mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend auf ein SDS-Gel geladen (siehe Punkt 2.12.3).

2.10.3 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation ist eine einfache Methode, mit der Proteininteraktionen nachgewiesen werden können. Durch die Immunpräzipitation eines Proteins, können auch direkt und indirekt assoziierte Proteine isoliert werden (Co-Immunpräzipitation). Diese co-immunpräzipitierten Proteine können z.B. durch einen Western Blot nachgewiesen werden

Für die Co-Immunpräzipitation wurden polare MDCK-SI-Zellen verwendet, die zuvor 4-5 Tage in Kulturschalen gewachsen waren. Es wurden jeweils zwei Schalen pro Ansatz verwendet, die aber separat aufgearbeitet wurden. Die Protokollschritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und jeweils mit 1 ml Co-IP Lysispuffer und 20 µl PI-Mix versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Kulturschale geschabt, in ein RG überführt und für 1 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues RG überführt. Ein *Preclearing* erfolgte mit 50 µl PAS pro Ansatz für mindestens 1 h. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 5.000 rpm und der Überstand wurde erneut in ein neues RG überführt. Es erfolgte die Zugabe von 50 µl mAb anti-Sec8 (8S-2E12). Den Kontrollen wurde kein Antikörper zugesetzt. Die Antikörper-Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei 4°C. Anschließend wurden 50 µl PAS pro RG zugegeben und für 2 h oder über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler geschwenkt.

Die Proben wurden für 1 min bei 5.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Gewaschen wurden die Proben 2x mit 1 ml 0,1% NP40 in PBS und 2x mit PBS. Den gewaschenen Proben wurde 30 µl SDS-Probenpuffer zugesetzt und auf ein SDS-Gel geladen (siehe Punkt 2.12.3).

2.10.4 DRM-Isolation

Detergenz resistente Membranen (DRMs) stellen spezielle Membranbereiche dar, die sich durch eine Unlöslichkeit in 1% Triton-X-100 bei 4°C auszeichnen. Die Isolierung der DRMs aus den MDCK-SI-Zellen erfolgte in zwei Schritten: im ersten Schritt wurde die Membranfraktion isoliert und im zweiten Schritt erfolgte die Isolierung der DRMs.

Polare MDCK-SI-Zellen wuchsen 4-5 Tage in Kulturschalen. Für einen Gradienten wurden fünf konfluente Schalen verwendet. Alle Protokollschritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die Zellen wurden 2x mit ca. 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in 2 ml PBS aufgenommen. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1.500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 3 ml 0,25 M Saccharose-Lösung durch Schütteln in Suspension gebracht. Die Suspension wurde für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit 3 ml einer 0,25 M Saccharose-Lösung und 60 µl PI-Mix (20 µl/ml) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte in der Reihenfolge: 10-faches auf- und abpipettieren mit einer 1 ml fassenden Pipettenspitze, 15-faches auf- und abziehen mit einer 22G-Kanüle (BD Biosciences) und ein manueller Aufschluss mit einem Homogenisator-Kolben durch 10-faches betätigen. Danach wurden die Zelltrümmer 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 ml abgenommen und mit 1,2 g Saccharose in einem neuen RG versetzt. Die Saccharose wurde auf einem Überkopfschüttler in Lösung gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl einer 1 M DTT-Lösung (Endkonzentration: 1 mM). Der Ansatz wurde in ein Zentrifugenröhrchen (Ultra Clear, Beckman Coulter) überführt und mit 6 ml einer 1,2 M Saccharose-Lösung vorsichtig überschichtet. Aufgefüllt wurde das Röhrchen mit einer 0,8 M Saccharose-Lösung. Die Phasengrenzen zwischen der 1,2 M und 0,8 M Saccharose-Lösung wurden mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation in einem Beckman SW41-Rotor für 19 – 20 h bei 38.000 rpm.

Nach der Zentrifugation befanden sich die gewünschten Membranfraktionen an der oberen Phasengrenze, auf Höhe des zuvor markierten Bereiches. Es wurden mit einer Pipette von oben 2 ml Lösung abgenommen und verworfen. Die nächsten 3 ml, welche die Membranen enthielten, wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit TNE-Puffer aufgefüllt, mit Parafilm versiegelt und mehrfach gut

geschüttelt, um ein homogenes Gemisch zu erhalten. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 60 min bei 38.000 rpm.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst mit 1,8 ml TNE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl einer 10% Triton-X-100 (in TNE) Stammlösung hinzugefügt (Endkonzentration: 1% (v/v) Triton-X-100 in TNE) und für 30 min auf Eis inkubiert. Für die Kontrolle wurden 200 µl einer 10% Saponin (in TNE) Stammlösung (Endkonzentration: 1% (w/v) Saponin in TNE) verwendet. Nach der Inkubation wurden 2 ml einer 2,4 M Saccharose-Lösung hinzugefügt und mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze auf- und abpipettiert, um eine homogene Durchmischung zu erreichen (Endkonzentration: 1,2 M). Das Zentrifugenröhrchen wurde mit 6 ml einer 1,1 M Saccharose-Lösung und mit 2 ml einer 0,15 M Saccharose-Lösung aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 18 h bei 38.000 rpm.

Nach der Zentrifugation wurden die 12 Fraktionen (oben: Fraktion 1; unten Fraktion 12) zu je 1 ml von oben nach unten in 1,5 ml RGs überführt. Die Abnahme der Fraktionen erfolgte mit Hilfe einer Glaskapillare und einer peristaltischen Pumpe. Direkt im Anschluss erfolgte die Proteinfällung mittels einer TCA/Aceton Fällung (siehe Punkt 2.12.2).

2.11 Metabolische Markierung

Die Oberflächen-Immunpräzipitation (Oberflächen-IP) ist eine Methode, mit der Proteine, die sich in oder an der Plasmamembran (Oberfläche) befinden, erfasst und quantifiziert werden können. Dabei werden die zuvor radioaktiv markierten Proteine durch eine Immunpräzipitation spezifisch an der Oberfläche isoliert und können später quantifiziert werden.

2.11.1 Oberflächen-Immunpräzipitation auf Transmembranfiltern

Die verwendeten MDCK-SI-Zellen wurden zuvor insgesamt 3x mit der entsprechenden siRNA transfiziert (siehe Punkt 2.8.2.1). Am 5.Tag nach Aussaat wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit Methionin-freiem Medium für 1 h inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und frisches Methionin-freies Medium, jeweils 1 ml zur apikalen und zur basolateralen Seite, zugegeben. Im Isotopenlabor wurde der basolateralen Seite dann zusätzlich zum Medium 10 µl [³⁵S]-Methionin (100 mCurie) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank des Isotopenlabors. Danach wurde das Medium abgesaugt und frisches MEM-Medium, 1 ml basolateral und 750 µl apikal, zugegeben. Für die Oberflächen-Immunpräzipitation wurden spezifische SI-Antikörper (SI-Antikörper 219 und 691; siehe Tabelle 2.2) entweder apikal oder basolateral zugegeben, um die SI spezifisch an der apikalen oder basolateralen Plasmamembran zu präzipitieren. Die Antikörper inkubierten für 2 h unter ständigem Schwenken der Platten bei 4°C, um eine ausreichende Antigen-Antikörper-Bindung zu gewährleisten.

Die Zellen wurden 5x mit 1 ml 0,1% BSA in PBS gewaschen und anschließend noch einmal mit 1 ml PBS. Zur apikalen Seite wurden 600 µl Lysispuffer und 20 µl PI-Mix gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von den Filtern geschabt und in ein RG überführt. Die Proben schwenkten für weitere 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler und zentrifugierten für 20 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues RG überführt, mit jeweils 50 µl PAS versetzt und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 1 min bei 5.000 rpm zentrifugiert und der Überstand (Lysat) in ein neues RG überführt. Die PAS wurde 2x mit Waschpuffer I und

2x mit Waschpuffer II gewaschen und anschließend mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt.

Der Überstand (Lysat) beinhaltet den intrazellulären SI-Anteil, der zuvor nicht spezifisch durch die Antikörper an der Plasmamembran gebunden und durch die PAS isoliert wurde. Dem Lysat wurde erneut Antikörper gegen die SI zugegeben und für 1 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurden jeweils 50 µl PAS pro RG pipettiert und für weitere 2 h bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Der Waschschrift und die Zugabe von SDS-Probenpuffer erfolgten analog wie zuvor beschrieben.

Alle Proben eines Experimentes wurden auf ein 6% SDS-Gel geladen und durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Punkt 2.12.3).

2.11.2 Oberflächen-Immunpräzipitation auf Kulturschalen

Die Oberflächen-IP auf Kulturschalen (Durchmesser: 10 cm) wurde entsprechend dem Protokoll der Oberflächen-IP auf den Transmembranfiltern durchgeführt (siehe Punkt 2.11.1). Die Volumina der entsprechenden Medien wurden um das Fünffache erhöht. Die Menge des Antikörpers und des [³⁵S]-Methionins blieben gleich. Die Menge des zugegebenen Lysispuffers betrug 1 ml.

2.11.3 Detektion und Auswertung

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel 45 min in einer Gel-Fixierlösung fixiert. Danach wurde das Gel für 1 h auf einem Vakuumtrockner (Eigenanfertigung des Instituts) getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einen *Screen* (Fujifilm oder BioRad) gelegt, der den radioaktiven Zerfall der mit [³⁵S]-Methionin markierten SI detektiert und für 3-4 Tage belassen. Anschließend erfolgte die Auswertung mit einem Phosphorimager (Fujifilm FLA-3000) und der BASReader Software. Die erhaltenen Daten wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet und mit der Gel-Pro Analyzer Software ausgewertet.

2.12 Biochemische Anwendungen

2.12.1 Herstellung der Zelllysate

Für die Herstellung der Zelllysate wurden konfluente Kulturschalen verwendet. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, mit 1 ml Lysispuffer (für Zelllysate) versetzt und in ein RG überführt. Das zähflüssige Zelllysate wurde mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Labsonic) homogenisiert.

Für die Ladungskontrollen wurden 5 – 10 µl der angefertigten Zelllysate verwendet und mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt.

2.12.2 TCA/Aceton Fällung

Die Proteine wurden mit TCA gefällt. Die 1 ml Proben wurden jeweils mit 500 µl einer 30%igen TCA-Lösung versetzt (Endkonzentration: 10%) und 5 min bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Die Proben wurden für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden mit 500 µl Aceton versetzt, kurz geschüttelt und 5 min bei RT geschwenkt. Danach wurden die Proben für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit Aceton. Die Proben wurden in einem Heizblock bei 42°C getrocknet und in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.12.3 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteinmischungen wurde das diskontinuierliche System nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet. Bei diesem System werden die Proben, die zuvor mit dem SDS-Probenpuffer versetzt worden sind, zunächst auf ein Sammelgel beladen und anschließend durch das darunterliegende Trenngel aufgetrennt. Die Proteine wandern dabei durch ein Geflecht aus vernetzten Polyacrylamidmolekülen, dessen Dichte mit der zugegebenen Menge aus Polyacrylamid (PAA) beeinflussbar ist. Dabei werden die Proteine nach der Größe ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Durch die Zugabe des negativ geladenen SDS, welches sich an die Proteine in einem konstanten Verhältnis anlagert, werden die Proteine einheitlich negativ geladen und wandern während der Auftrennung zum Plus-Pol der angelegten elektrischen Spannung.

Desweiteren bewirkt SDS die Denaturierung der Proteine, dessen Effekt durch die Zugabe von DTT (spaltet Disulfidbrücken) erhöht wird. Dadurch werden Protein-Protein-Interaktionen unterbunden, die sich störend auf das Laufverhalten auswirken würden.

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten in einer dafür vorgesehenen Gießvorrichtung gegossen. In Tabelle 2.4 sind die Substanzen der verwendeten Trenngele aufgeführt. Temed und APS führen zu einer Vernetzung des flüssigen PAAs. Das Sammelgel (7,8 ml ddH₂O; 1,95 ml PAA 30%; 1,45 ml 1 M Tris (pH 6,8); 57,5 µl 20% (w/v) SDS; 11,5 µl Temed; 155 µl 10% (w/v) APS) hatte für alle verwendeten Trenngele die gleiche Zusammensetzung.

Trenngel	6% SDS-Gel	10% SDS-Gel	12% SDS-Gel
ddH ₂ O	8,25 ml	6,15 ml	4,95 ml
PAA 30%	3,1 ml	5,15 ml	6,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,85 ml	3,85 ml	3,85 ml
20% (w/v) SDS	77,5 µl	77,5 µl	77,5 µl
Temed	11,5 µl	11,5 µl	11,5 µl
10% (w/v) APS	155 µl	155 µl	155 µl

Tabelle 2.4 Trenngel

Die Proben wurden für 5 min bei 95°C aufgeköcht und kurz bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel beladen. Als Molekulargewichtstandard wurde der *PageRuler™Plus Prestained* (Fermentas) verwendet. Die elektrische Anfangsspannung betrug 80 V, bis sich die gebildete Lauffront (sichtbar durch das Bromphenolblau in dem SDS-Probenpuffer) im Trenngel befand. Danach erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf 200 V.

2.12.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine eines Gels wurden mittels des Western Blot Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Nitrozellulose-Membranen binden Proteine mit einer hohen Affinität. Diese Affinität wird durch Methanol, welches sich im Transferpuffer befindet, stark gesteigert. Auf der Membran sind die aufgetrennten Proteine für weitere Untersuchungen zugänglich.

Das Gel wurde kurz in Transfer-Puffer geschwenkt und auf eine zugeschnittene Nitrozellulose-Membran gelegt. Der Aufbau für den Western Blot, der sich auf dem Blot-Gerät befand, hatte von unten nach oben folgende Schichtung: ein Blot-Papier (Gel Blotting Papier GB005, Whatman), die Nitrozellulose-Membran, das Gel und ein weiteres Blot-Papier. Alle verwendeten Lagen waren mit Transfer-Puffer benetzt oder getränkt.

Der Transfer der negativ geladenen Proteine in dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte für 55 min bei 12 V. Die eingestellte Stromstärke betrug bei einem Gel 250 mA und bei zwei Gelen 400 mA. Nach dem Transfer der Proteine wurden die noch freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran durch Inkubation in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 60 min gesättigt.

2.12.5 Immunfärbung und Auswertung

Die Zielproteine auf den angefertigten Membranen wurden durch spezifische Antikörper markiert und durch Sekundärantikörper detektiert (siehe Tabelle 2.2).

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Danach folgte ein Waschschrift mit PBS für 3x 10 min auf einem Horizontalschüttler. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 1 h bei RT. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS für 3x 10min.

Die Sekundärantikörper sind mit dem Enzym Meerrettich-Peroxide gekoppelt. Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und führt zu einer Chemilumineszenz. Das entstehende Licht kann mit einer Chemilumineszenzkamera detektiert werden. Dafür wurde gebrauchsfertige ECL-Lösung (Apbiotech) oder angesetzte ECL-Lösung verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Chemilux Imager (Intas). Die Bearbeitung der erstellten Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop.

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation von Sec6 an SI-tragenden Vesikeln aus MDCK-SI-YFP-Zellen

Ein Ziel der Arbeitsgruppe Jacob besteht in der Identifizierung von Proteinen, die am apikalen Transport in polaren Epithelzellen beteiligt sind. Um Proteine zu identifizieren, die mit LPH- oder SI-tragenden Vesikeln assoziiert sind, kann nach einer Vesikelisolation eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Die 2D-Gelelektrophorese trennt die Proteine mittels ihres isoelektrischen Punktes in der 1.Dimension und ihres Molekulargewichtes in der 2.Dimension auf. Zur Identifikation der aufgetrennten Proteine kann die MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorbtions ionization – time of flight*) Analyse verwendet werden. Dadurch konnte Galektin-3 an LPH-tragenden Vesikeln identifiziert werden (Delacour *et al.*, 2006). An SI-tragenden Vesikeln konnte auf diese Weise Sec6, eine Untereinheit des Exocyst-Komplexes, nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Assoziation von Sec6 mit SI-haltigen Vesikeln 20 min nach Verlassen des *trans*-Golgi Netzwerkes. Im Rahmen dieser Arbeit befasste sich die Fragestellung mit der Bedeutung von Sec6 im apikalen Transport von SI-tragenden Vesikeln in MDCK-Zellen.

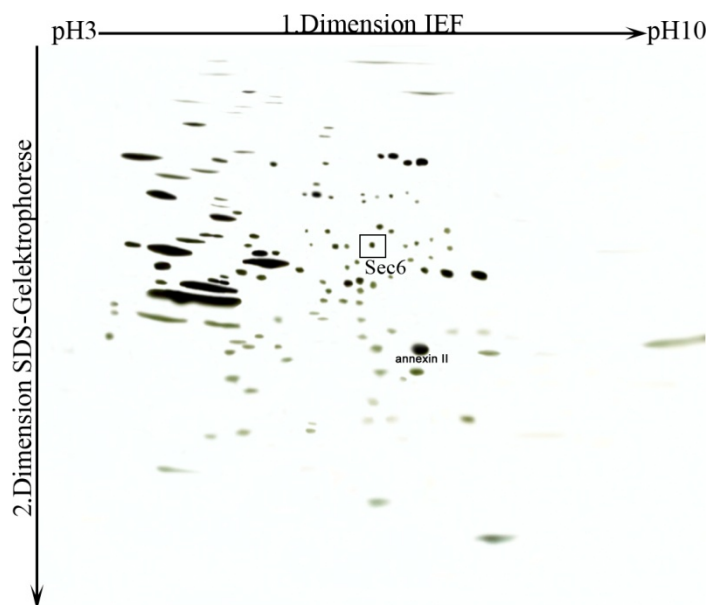


Abbildung 3.1: 2D-Gel

Auftrennung der Proteine, die an SI-tragenden Vesikeln 20 min nach Verlassen des TGNs in polaren MDCK-SI-YFP-Zellen vorkommen. Die 1.Dimension trennt die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) auf. Die 2.Dimension trennt die Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-Gelelektrophorese auf. Identifiziert wurden die Proteine durch eine MALDI-TOF Analyse. Markiert (Rahmen) ist Sec6. Beschriftet ist Annexin II (Jacob *et al.*, 2004).

(Abb. von Delphine Delacour)

3.2 Vesikel-Isolation aus MDCK-SI-YFP- und MDCK-SI-Zellen

Nach der Auswertung der MALDI-TOF Ergebnisse und der Identifizierung der möglichen Assoziation von Sec6 mit SI-YFP-haltigen Vesikeln in MDCK-SI-YFP-Zellen, wurde überprüft, ob Sec6 auch mittels Western Blot Analysen nach Vesikelisolation aus MDCK-SI-YFP-Zellen nachweisbar ist. Trotz der guten Funktionalität des Antikörpers gegen Sec6 in der Immunfluoreszenz, erwies sich der Antikörper in Western Blot Analysen als nicht geeignet. Aufgrund der Datenlage über den Aufbau des Exocyst-Komplexes aus den bekannten acht Untereinheiten und der direkten Interaktion von Sec6 mit Sec8 (Munson und Novick, 2006), wurde Sec8 als Zielprotein für die Western Blot Analysen gewählt.

3.2.1 Lokalisation von Sec8 im Saccharose-Stufengradienten

Für die Vesikelisolation wurden die Fraktionen 8-10 nach Auftrennung der Zellorganellen durch die Ultrazentrifugation (siehe Punkt 2.10.2) verwendet. Um die Verteilung von Sec8 im Saccharose-Stufengradienten zu überprüfen, wurden MDCK-SI-YFP Gradienten angefertigt und 12 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Die verwendeten Zellen befanden sich dabei im Gleichgewichtszustand oder *steady state*-Zustand: sie wurden direkt nach Entnahme aus dem Brutschrank verarbeitet. Die Verteilung der Proteine SI und Sec8 sind in Abbildung 3.2 A dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass sich die größte Proteinmenge von Sec8 zusammen mit der SI in Fraktion 9 befindet. Für die SI erkennt man zwei Banden, die obere stellt die komplex-glykosylierte Form (SI_c) und die untere die mannosereiche Form der SI (SI_n) dar (siehe Punkt 1.6).

3.2.2 Sec8 ist mit SI-tragenden Vesikeln assoziiert

Um zu überprüfen, ob SI und Sec8 gemeinsam in Vesikeln zu finden sind, wurde eine Vesikelisolation durchgeführt (siehe Punkt 2.10.2). Die verwendeten MDCK-SI-YFP-Zellen wurden 4 h bei 20°C in Anwesenheit von Cycloheximid geblockt und anschließend 20 min bei 37°C inkubiert, um den Vesikel-Transport aus dem TGN (TGN-Release) zu induzieren (Matlin und Simons, 1983). Diese Bedingungen sind identisch denen der vorangegangenen MALDI-TOF Analyse, die zur Identifizierung von Sec6 an SI-tragenden Vesikeln führte. In Abbildung 3.2 B ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt, der die Assoziation von Sec8 mit SI-tragenden Vesikeln 20 min nach TGN-

Release zeigt. Die Kontrolle zeigt eine schwache Bande von Sec8, welche als unspezifische Bindung von Sec8 an die Protein-A-Sepharose unter den gegebenen Protokollbedingungen gedeutet werden muss. Aufgrund des deutlich stärkeren Signals in der Vesikel-IP, ist aber von einer Vesikelassoziation von Sec8 mit SI-YFP-tragenden Vesikeln auszugehen.

3.2.3 Die komplexe Form der SI ist mit Sec8-haltigen Vesikeln assoziiert

Zur Bestätigung der zuvor gewonnenen Daten, wurde analog eine Vesikelisolation gegen Sec8 durchgeführt und die Assoziation von der SI mit Sec8-positiven Vesikeln überprüft. Für die Vesikelisolation wurde der mAb anti-Sec8 (8S-2E12) verwendet (siehe Tabelle 2.2). Die MDCK-SI-Zellen wurden 4 h bei 20°C in Anwesenheit von Cycloheximid und anschließend 20 min bei 37°C inkubiert, wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben.

Deutlich erkennbar in Abbildung 3.2 C ist die Assoziation der komplex-glykosylierten SI (SI_c) mit Sec8-haltigen Vesikeln. Das zeigt eine Assoziation von SI-tragenden post-Golgi Vesikeln mit Sec8 20 min nach Verlassen des TGNs. Die Kontrolle zeigt unter den gegebenen Protokollbedingungen ein schwaches Signal von Sec8.

3.3 Sec8 und SI interagieren nicht direkt miteinander

Zwei unabhängige Experimente konnten eine Assoziation von Sec8 mit SI-haltigen Vesikeln in MDCK-SI-YFP- und MDCK-SI-Zellen zeigen. Ob hier eine direkte Verbindung gegeben ist, wurde mittels einer Co-IP gegen Sec8 überprüft (siehe Punkt 2.10.3). In Abbildung 3.2 D wird deutlich, dass keine direkte Protein-Protein-Interaktion von Sec8 mit SI oder eine indirekte Interaktion über andere Proteine vorliegt. Bei Anwesenheit von Detergenzien in den verwendeten Puffern kommt es nicht zu einer unspezifischen Bindung von Sec8 an die Protein-A-Sepharose.

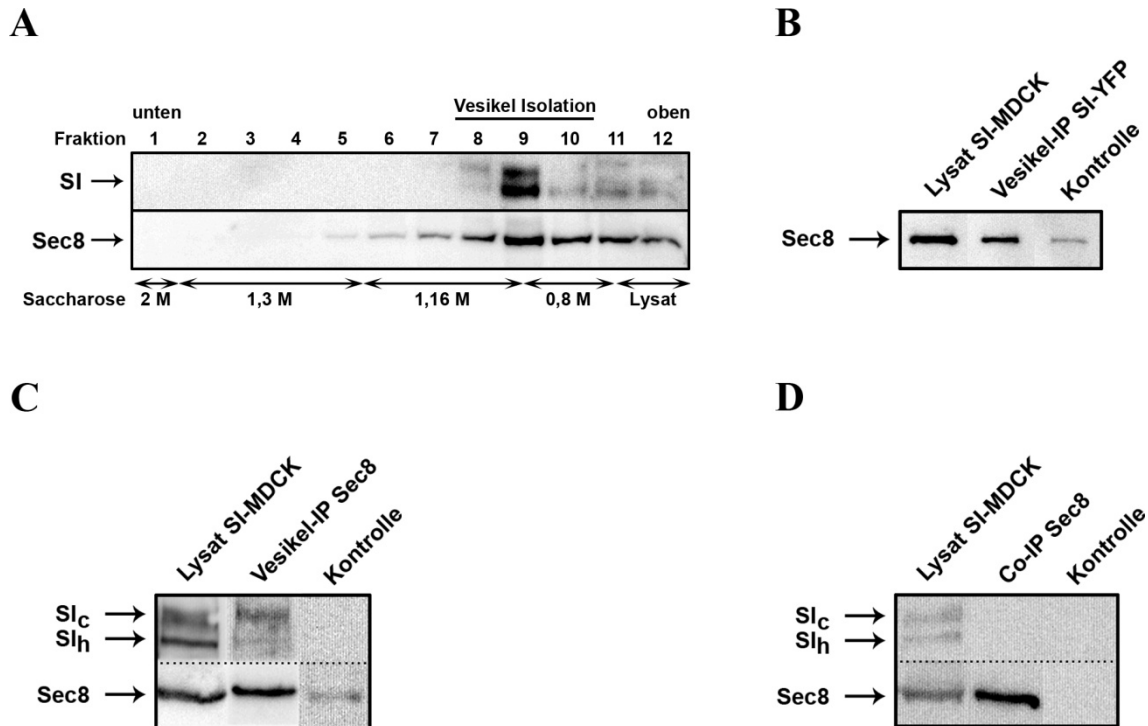


Abbildung 3.2: Fraktionen, Vesikel-IPs und Co-IP

A) Fraktionen: Auftrennung von Zellbestandteilen durch Ultrazentrifugation homogenisierten MDCK-SI-YFP-Zellen, die sich im *steady state*-Zustand befanden. Angegeben ist die Saccharose-Gradientenschichtung vor der Zentrifugation. Die Fraktionen wurden vom Boden (Fraktion 1) nach oben (Fraktion 12) zu je 1 ml abgenommen. Die SDS-Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Proteine. Dem Transfer auf die Nitrozellulose-Membran folgte die Antikörper-Inkubation gegen Sec8 und SI.

B) Vesikel-IP gegen SI-YFP und C) Vesikel-IP gegen Sec8: MDCK-SI-YFP- (B) oder MDCK-SI-Zellen (C) wurden 4 h bei 20°C inkubiert, gefolgt von einem TGN-Release für 20 min bei 37°C. Die Vesikel-Isolation erfolgte nach der Zentrifugation aus den Fraktionen 8-10 durch pAb anti-GFP gegen SI-YFP (B) und mAb anti-Sec8 (8S-2E12) gegen Sec8 (C). Den Kontrollen wurde kein Antikörper zugesetzt. Die Proteine der immunpräzipitierten Vesikel wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf die Nitrozellulose-Membran, erfolgte die Antikörperinkubation gegen Sec8 und SI.

D) Co-IP gegen Sec8: Einer Lyse von MDCK-SI-Zellen folgte eine Antikörper-Inkubation mit mAb anti-Sec8 (8S-2E12) gegen Sec8. Der Kontrolle wurde kein Antikörper zugesetzt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit mAb anti-Sec8 (14G1) und mAb anti-SI (HBB 3/705) inkubiert.

SI_c: komplex-glykosylierte SI; SI_h: mannosereiche SI; gestrichelte Linie: trennt verschiedene Bereiche eines Blots; durchgezogene Linie: trennt zwei Blots

3.4 RNA-Interferenz und Oberflächenimmunpräzipitation mit MDCK-SI-Zellen

Um einen möglichen Effekt des Exocyst-Komplexes auf den Transport von SI-tragenden Vesikeln an die apikale Membran in polaren MDCK-Zellen zu untersuchen, wurde siRNA gegen das Zielprotein Sec8 (siRNA-Sec8) generiert (siehe Punkt 2.6). Aufgrund der Schwierigkeiten des Antikörpers mAb anti-Sec6 (9H5) an Sec6 in Western Blot Analysen zu binden und der damit verbundenen Schwierigkeiten in Kontrollexperimenten, wurde Sec8 als Zielprotein gewählt.

3.4.1 Spezifische siRNA reduziert endogenes Sec8 in MDCK-SI-Zellen

Dieser Versuch sollte zunächst zeigen, wie effizient sich die generierte siRNA-Sec8 auf den endogenen Pool von Sec8 in MDCK-SI-Zellen auswirkt. Zur Verbesserung der Effizienz wurden zwei siRNA-Stränge zur Verminderung von Sec8 verwendet (siehe Punkt 2.6). Die verwendeten MDCK-SI-Zellen wurden 3x mit siRNA-Sec8 transfiziert und das gewonnene Zelllysate mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die angefertigten Western Blots wurden mit Antikörpern gegen Sec8 und Aktin inkubiert. Wie in den Abbildungen 3.3 A und B zu sehen ist, konnte die endogene Sec8 Proteinmenge im Vergleich zu der Proteinmenge in den Kontrollzellen, die analog mit siRNA gegen Luciferase (siRNA-Luc) transfiziert wurden, auf ungefähr 20% reduziert werden. Ein Effekt ist somit deutlich erkennbar, jedoch gelang keine stärkere Verminderung von Sec8.

3.4.2 Knockdown von Sec8 hat keinen Effekt auf den Transport der SI

Zur Untersuchung eines möglichen Einfluss von Sec8 auf den apikalen Transport von SI, wurde eine Oberflächenimmunpräzipitation mit siRNA-Sec8 transfizierten MDCK-SI-Zellen durchgeführt. Das Experiment wurde, wie unter Punkt 2.11.2 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit einem Phosphorimager (Fujifilm FLA-3000; Raytest). In den Abbildungen 3.3 C und D ist kein Unterschied der Oberflächenintensität der SI in siRNA-Sec8 transfizierten MDCK-SI-Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Die SI wird in siRNA-Sec8 transfizierten Zellen weiterhin effizient an die Plasmamembran transportiert. In der Plasmamembran (Oberfläche) ist nur die SI_c vorhanden, im Lysat (SI, die sich noch nicht in der Plasmamembran befand)

sind beide Formen, SI_h und SI_c , vorhanden. Zur besseren Orientierung sind „Oberfläche“ und „Lysat“ eines Geles untereinander angeordnet.

3.4.3 Knockdown von Sec8 hat keinen Effekt auf die Sortierung der SI

Die zuvor durchgeführte Oberflächen-IP zeigte keinen Effekt auf den Transport der SI an die Oberfläche in siRNA-Sec8 transfizierten MDCK-SI-Zellen. Eine mögliche Fehlsortierung der SI in die basolaterale Plasmamembran kann auf diese Weise nicht untersucht werden. Für die Fragestellung der Fehlsortierung wurden MDCK-SI-Zellen verwendet, die auf Transmembranfiltern gewachsen sind und eine Immunpräzipitation von der basolateralen und apikalen Membran ermöglichen.

Für dieses Experiment wurden MDCK-SI-Zellen, die auf *6-well*-Filtern wuchsen, 3x mit siRNA-Sec8 oder siRNA-Luc transfiziert (siehe Punkt 2.8.2.1). Das Experiment wurde, wie unter Punkt 2.11.1 beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.3 E und F dargestellt. In Abbildung 3.3 E erkennt man an der apikalen (kurz „a“) Oberfläche die SI_c , hingegen findet sich an der basolateralen (kurz „b“) Oberfläche kein Signal der SI_c . Die SI_c ist somit korrekt an die apikale Membran transportiert worden. Im Vergleich der Oberflächensignalstärken von siRNA-Sec8 und Kontrolle, erkennt man keinen wesentlichen Unterschied (Abbildung 3.3 F).

Im Lysat erkennt man die SI_c und SI_h . Die Banden der basolateralen Seite des Lysates, insbesondere der SI_c , sind deutlich Signal intensiver, als die Banden der apikalen Seite. Dies erklärt sich dadurch, dass im Lysat der basolateralen Seite auch die SI_c , die sich schon in der apikalen Plasmamembran befand, enthalten ist.

Im Vergleich von siRNA-Sec8 und Kontrolle zeigt sich auch hier kein Unterschied. Die Schwankungen in den Signalstärken, dargestellt in Form der Fehlerbalken, entstehen durch die nur zweimalige Durchführung des Experimentes.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes festhalten. Der *Knockdown* auf 20% der regulären Menge von Sec8 in polaren MDCK-SI-Zellen mittels siRNA-Sec8, hat keinen Einfluss auf den Transport der SI an die apikale Oberfläche und führt darüber hinaus zu keiner Fehlsortierung an die basolaterale Plasmamembran.

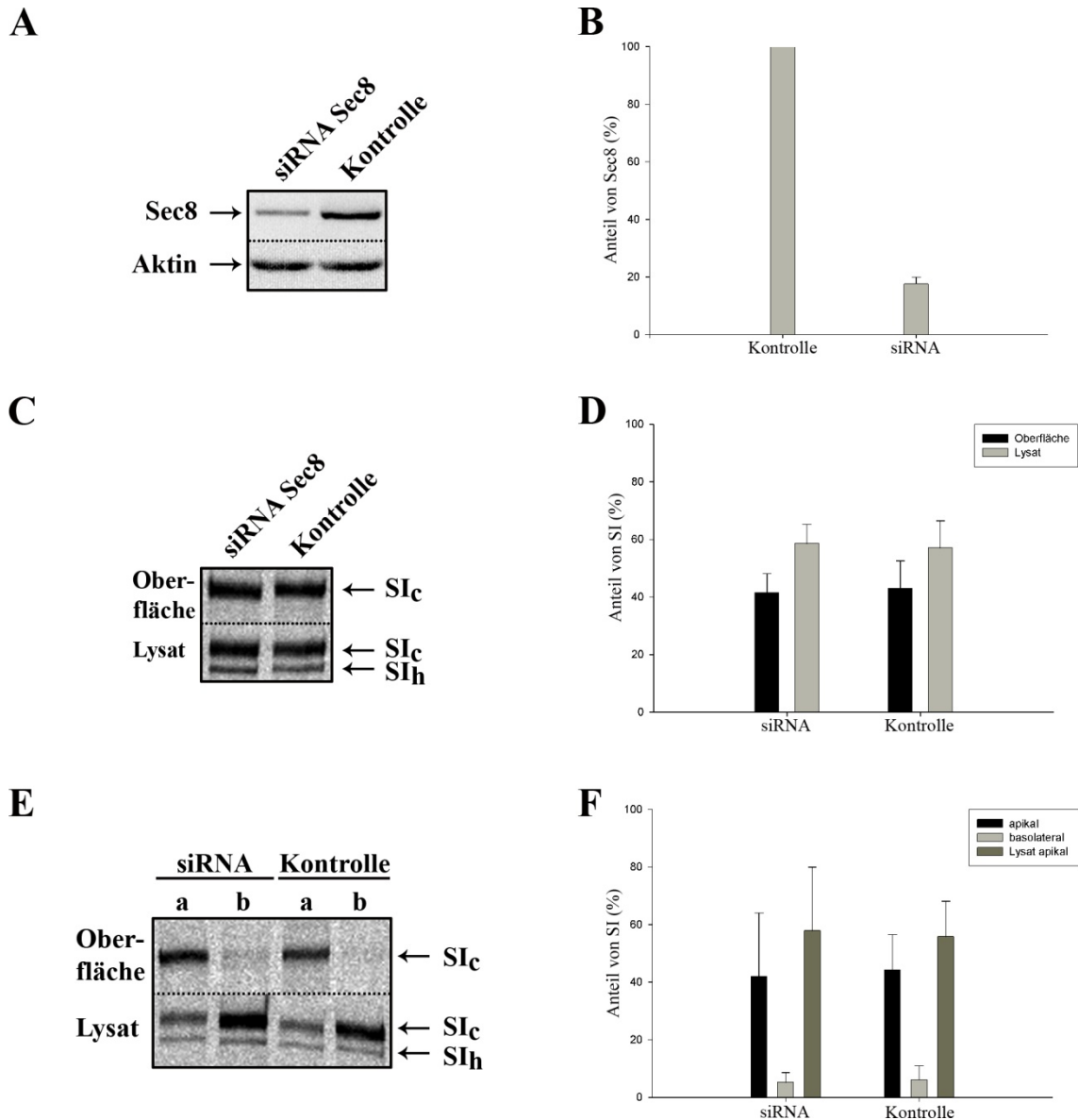


Abbildung 3.3: siRNA-Test und Oberflächen-IPs mit MDCK-SI-Zellen

A) und B) siRNA-Test: MDCK-SI-Zellen wurden 3 Tage mit siRNA gegen Sec8 oder gegen Luciferase (Kontrolle) transfiziert und anschließend lysiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen Sec8 und Aktin inkubiert. In B) ist die graphische Darstellung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

C) bis F) Oberflächen-IPs: MDCK-SI-Zellen wurden 3 Tage mit siRNA-Sec8 oder siRNA-Luc (Kontrolle) transfiziert. Vor der Oberflächen-IP wurden die Zellen mit [³⁵S]-Methionin für 5 h inkubiert. Die SI wurde mittels anti-SI-Antikörper immunpräzipitiert. In C) und D) wuchsen die Zellen in Kulturschalen, in E) und F) auf Transmembranfiltern, die die Unterscheidung zwischen apikaler (a) und basolateraler (b) Membran erlauben. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Detektion der Signale erfolgte nach Fixierung, Trocknung und Exposition des Geles mit einem Phosphorimager. Dargestellt ist die Verteilung der komplex-glykosylierten SI (SI_c) und der mannosereichen SI (SI_h).

In D) erkennt man die graphische Darstellung von drei unabhängigen Experimenten. In F) sind zwei unabhängige Experimente dargestellt. Die Darstellung der basolateralen Lysat Bande wurde aufgrund der Übersichtlichkeit in F) weggelassen.

3.5 Mikroskopische Untersuchungen von COS-7- und MDCK-SI-YFP-Zellen

Sortiersignale in polaren Zellen, die zur selektiven Anreicherung von Proteinen in der apikalen oder basolateralen Plasmamembran führen, sind evolutionär konserviert und finden sich auch in unpolaren Zellen (Yoshimori *et al.*, 1996). In unpolaren Zellen kommt es in der Plasmamembran jedoch wieder zu einer Vermischung der Proteine, die womöglich über unterschiedliche Transportwege an die Plasmamembran transportiert worden. Aufgrund dieser Grundlage, kann man in einem gewissen Maße, Transportprozesse vom TGN zur Plasmamembran auch in unpolaren Zellen untersuchen. Dafür eignen sich besonders gut COS-7-Zellen, da sie morphologisch flach sind und mikroskopisch gut zu untersuchen sind.

3.5.1 SI-YFP kolokalisiert nicht mit Sec6/8 in COS-7-Zellen

Um eine mögliche Interaktion zwischen Sec6 und Sec8 mit SI-YFP-tragenden Vesikeln zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit dem SI-YFP-Konstrukt transfiziert und die Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8 mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Zellen wurden zunächst im sog. *steady state*-Zustand betrachtet. Die mit SI-YFP transfizierten Zellen wurden direkt nach Entnahme aus dem Inkubator fixiert und immunhistochemisch gegen Sec6 oder Sec8 gefärbt. Untersucht wurden die angefertigten Präparate mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop. Ziel war es, eine mögliche Assoziation (Kolokalisation) von SI-YFP-markierten Vesikeln mit den Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8 zu zeigen.

Mikroskopisch konnte in den zweifach positiven Zellen, SI-YFP und Sec6 bzw. Sec8 positiv, keine Kolokalisation von SI mit Sec6 bzw. Sec8 gezeigt werden. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion mit SI-YFP zeigte sich folgendes Verteilungsmuster (Abb. 3.4 A und B). Die SI-YFP war überwiegend in vesikulären Strukturen zu finden und teils in die Plasmamembran integriert. Die Sec-Proteine waren zum größten Teil in der Nähe des Zellkerns gruppiert. Es zeigte sich ebenfalls ein vesikuläres Muster. Eine eindeutige Überlagerung von SI-YFP mit Sec6/8 konnte im *steady state*-Zustand nicht gezeigt werden. In den nachfolgenden Bildern ist nur noch Sec6 dargestellt, da es in der Lokalisation von Sec8 und dem Verhalten gegenüber der SI-YFP keinen Unterschied zu sehen gab.

Sekretorische Proteine lassen sich mittels eines 20°C Temperaturblocks im TGN anreichern (Matlin und Simons, 1986). Das TGN gilt somit als ein induzierbares Kompartiment. Im *steady state*-Zustand oft nur aus einer Zisterne bestehend, kann er durch einen 20°C Temperaturblock oder in sekretorisch aktiven Zellen stark vergrößert sein und mehrere Zisternen aufweisen (De Matteis und Luini, 2008).

Um eine mögliche Interaktion am TGN zu untersuchen, inkubierten die mit SI-YFP transfizierten COS-7-Zellen 4 h bei 20°C. Direkt danach folgte die Methanolfixierung und die Zellen wurden immunhistochemisch gegen Sec6 gefärbt. Auf eine spezifische Markierung des TGNs wurde verzichtet. Aufgrund des durchgeführten Protokolls und der charakteristischen Lokalisation, kann vom TGN ausgegangen werden. In Abbildung 3.4 C ist die SI-YFP deutlich im Bereich des TGNs angereichert, vesikuläre Strukturen sind im Vergleich zum *steady state*-Zustand deutlich weniger vorhanden. Eine Sekretion hat zuvor stattgefunden, erkennbar an dem Vorhandensein der SI-YFP in der Plasmamembran. Die Lokalisation von Sec6 weist im Vergleich zum *steady state*-Zustand keine wesentlichen Veränderungen auf. Die Gruppierung um den Zellkern in Form vesikulärer Strukturen ist weiterhin deutlich erkennbar. Auffallend ist die Aussparung im Bereich des TGNs.

Zusammenfassend findet sich weder im *steady state*-Zustand noch nach einem 20°C Temperaturblock eine Koloalisation der SI-YFP mit Sec6 bzw. Sec8.

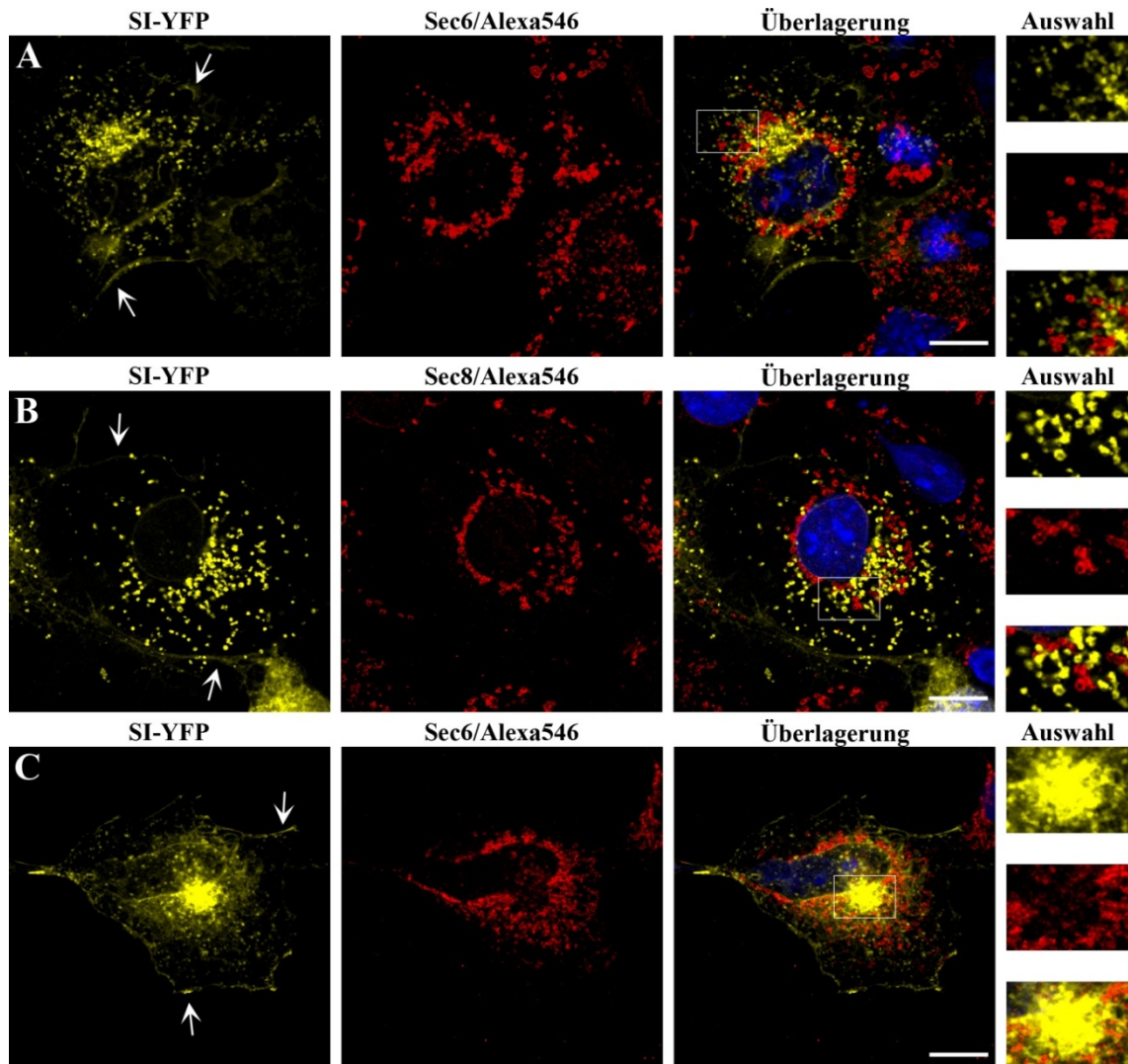


Abbildung 3.4 Mikroskopische Untersuchung von SI-YFP und Sec6/8 in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit dem SI-YFP Konstrukt transfiziert und die Expression erfolgte für 48 h. Nach der Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung gegen Sec6 bzw. Sec8 durch die Antikörper mAb anti-Sec6 (9H5) und mAb anti-Sec8 (14G1). Als Sekundärantikörper wurde der pAb Alexa546 verwendet. Die Zellkerne (blau) wurden mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt. Maßstab: 20 μ m

A) und B) steady state-Zustand: SI-YFP (gelb) befindet sich überwiegend in vesikulären Strukturen und in der Plasmamembran (Pfeile). A) Sec6 (rot) und B) Sec8 (rot) befinden sich in vesikulären Strukturen überwiegend um den Zellkern gruppiert. In der Überlagerung findet sich keine Kolokalisation von SI-YFP mit Sec6/8.

C) TGN-Temperaturblock für 4 h bei 20°C: SI-YFP (gelb) ist deutlich im Bereich des TGNs akkumuliert. Zuvor fand ein Transport an die Plasmamembran statt (Pfeile). Sec6 befindet sich in vesikulären Strukturen in der Nähe des Zellkerns. Der Bereich des TGNs bleibt ausgespart. In der Überlagerung findet sich keine eindeutige Kolokalisation von SI-YFP mit Sec6.

3.5.2 Rab-4, Rab-8 und Rab-11 kolokalisieren mit Sec6 in COS-7-Zellen

Nach der Auswertung der zuvor angefertigten konfokal-mikroskopischen Bilder, stellte sich die Frage, um welche Kompartimente es sich bei den Sec6 und Sec8 positiven Bereichen handelt. Bestimmte Rab-Proteine (kleine GTPasen, die im GTP gebundenen Zustand an Membranen binden) dienen als Markerproteine für Endosomen (Schwartz *et al.*, 2007).

COS-7-Zellen wurden mit Rab4-CFP, Rab8-CFP und Rab11-CFP Konstrukten transfiziert und Sec6 immunhistochemisch markiert. Die fixierten COS-7-Zellen befanden sich im *steady state*-Zustand. In der gezeigten Rab11-CFP und Sec6/Alexa546-positiven Zelle ist deutlich eine Kolokalisation der beiden Fluoreszenzsignale sichtbar (Abb. 3.5 A). Diese befinden sich vor allem um den Kern gruppiert und peripher in vesikulären Strukturen. Neben diesen zweifach positiven Bereichen finden sich auch Bereiche, die nur Rab11-CFP oder Sec6 positiv sind. In Abbildung 3.5 B erkennt man eine Rab8-CFP-positive Zelle, in der eine deutliche Kolokalisation der Rab8-positiven Strukturen mit Sec6 zu sehen ist. In den Rab4-CFP-positiven Zellen findet sich eine nahezu komplette Kolokalisation von endogenem Sec6 mit Rab4 (Abb. 3.5 C). Neben den Rab4- und Sec6-positiven Strukturen, die teils vesikulär teils tubulär sind, erkennt man auch Strukturen, die nur Rab4-CFP enthalten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass endogenes Sec6 mit Rab4-CFP, Rab8-CFP und Rab11-CFP in COS-7-Zellen kolokalisiert. Die Lokalisation von Sec6 wäre demzufolge dem *Recycling Endosome* und dem *Early Endosome* zuzuordnen (siehe Punkt 4.3).

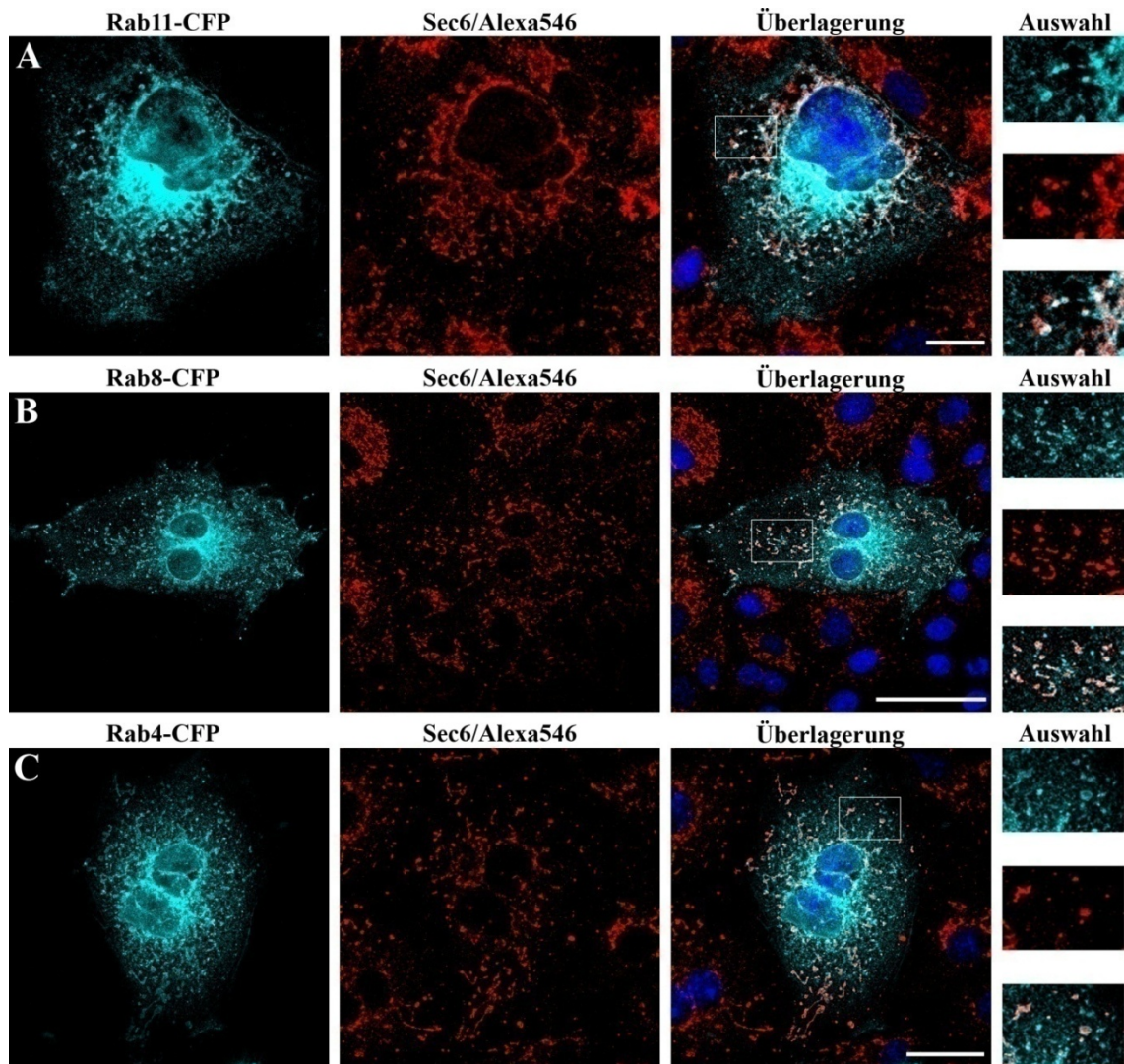


Abbildung 3.5 Sec6 und endosomale Kompartimente in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit verschiedenen Rab-CFP Konstrukten transfiziert. Die Fixierung erfolgte für **A)** und **C)** 48 h und für **B)** 24 h nach Transfektion im *steady state*-Zustand. Endogenes Sec6 wurde mit den Antikörpern mAb anti-Sec6 (9H5) und pAb Alexa546 markiert. Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt (blau). Für alle transfizierten Rab-Proteine findet sich eine Überlagerung mit endogenem Sec6. Die größte Übereinstimmung findet sich von Sec6 mit Rab4-CFP. Maßstab: 20 µm

3.5.3 SI kolokalisiert mit Sec6 an der lateralen Membran in MDCK-SI-YFP-Zellen

Die mikroskopischen Untersuchungen in unpolaren COS-7-Zellen ergaben keinen Anhalt für eine Kolokalisation von SI-YFP-haltigen Vesikeln mit den Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8. Es ist bekannt, dass sich der Exocyst-Komplex in MDCK-Zellen nach Ausbildung der Zellpolarität überwiegend im oberen Bereich der lateralen Plasmamembran befindet. Dieser Bereich kolokalisiert mit dem *Tight Junction* assoziierten *zonula occludens-1* (ZO-1) Protein (Grindstaff *et al.*, 1998). Aufgrund der Daten aus der 2D-Gelelektrophorese und der MALDI-TOF Analyse sowie den

durchgeführten Vesikel-IPs mit MDCK-SI-YFP und MDCK-SI-Zellen, wurden konfokalmikroskopische Bilder mit polaren MDCK-SI-YFP-Zellen angefertigt, um eine mögliche Assoziation von SI-YFP-haltigen Vesikeln mit Sec6 zu untersuchen.

Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden MDCK-SI-YFP-Zellen verwendet, die fünf Tage auf Transmembranfiltern gewachsen waren. Vor der Methanolfixierung wurde ein TGN-Block für 4 h bei 20°C und ein folgender TGN-Release für 20 min bei 37°C durchgeführt. Diese Bedingungen gleichten denen, die zur Detektion von Sec6 an SI-YFP-haltigen Vesikeln führte.

Nach der Fixierung erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Sec6 und Sec8. Sec8 ist nur in Abbildung 3.6 E abgebildet, da sich die Lokalisation von Sec8 nicht von der Sec6-Lokalisation unterscheiden ließ. Zur Markierung der lateralen Membran wurde zusätzlich noch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen β -Catenin durchgeführt (Abb. 3.6 D und E). β -Catenin ist ein Marker der lateralen Membran in polaren Epithelzellen.

Die SI-YFP ist in der apikalen Membran (Abb. 3.6 A, D, E) und in vesikulären Strukturen lokalisiert (Abb. 3.6 B, C). Deutlich erkennbar ist das unterschiedliche Verteilungsmuster von Sec6 im Vergleich zu dem in COS-7-Zellen. Das stärkste Signal von Sec6 zeigt sich im oberen Bereich der lateralen Membran (Abb. 3.6 D). Diese Region befindet sich in unmittelbarer Nähe der *Tight Junctions* (Grindstaff *et al.*, 1998). Hingegen erkennt man intrazellulär ein diffuses Muster ohne deutlich abgrenzbare Strukturen (Abb. 3.6 B, C, D). Eine Kolo-kalisation von SI-YFP mit Sec6 zeigt sich nur in dem von Sec6 markierten, oberen Bereich der lateralen Membran. In Abbildung 3.6 B (Ausschnitt) erkennt man SI-YFP-haltige Strukturen in unmittelbarer Nähe zur Sec6-positiven lateralen Membran.

Die Lokalisation von Sec6 und Sec8 in polaren MDCK-SI-YFP-Zellen änderte sich durch Veränderungen in den Inkubationsbedingungen nicht. Im *steady state*-Zustand befand sich Sec6 und Sec8 ebenfalls im oberen Bereich der lateralen Membran (Bilder nicht gezeigt).

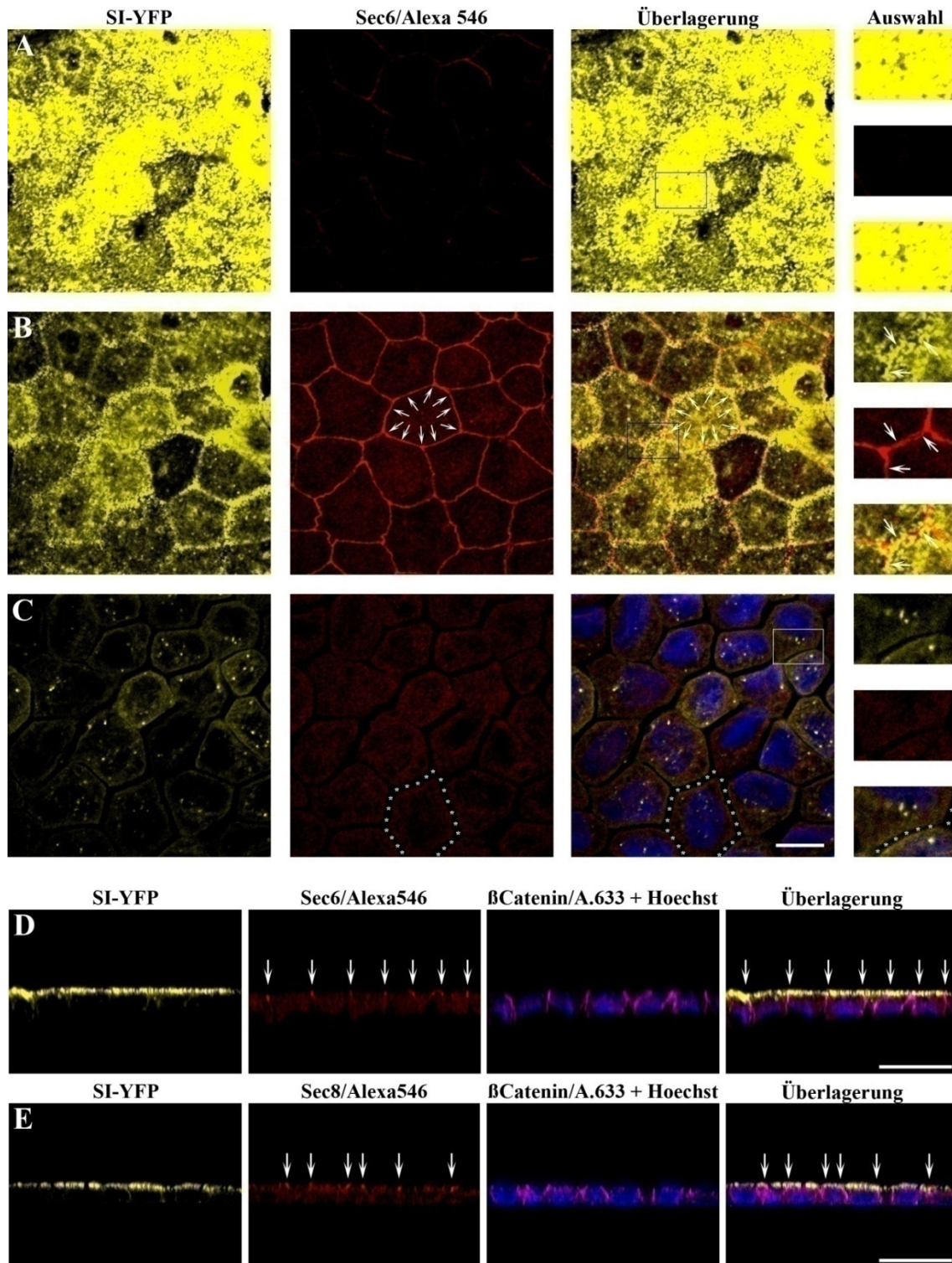


Abbildung 3.6 MDCK-SI-YFP-Zellen nach TGN-Temperaturblock und 20 min TGN-Release

A) bis C) Aufnahme von polaren MDCK-SI-YFP-Zellen im xy-Scan (Draufsicht). **D) und E)** xz-Scans (Seitensicht) von MDCK-SI-YFP-Zellen. Apikale Seite (A), oberes Drittel (B) und unteres Drittel (C) derselben Zellen. SI-YFP ist hauptsächlich apikal (A, D, E) lokalisiert und intrazellulär in vesikulären Strukturen (B, C). Sec6 findet sich fast ausschließlich an der oberen, lateralen Membran (B, D, Pfeile). Intrazellulär ist von Sec6 und Sec8 ein diffuses Muster erkennbar (B – E). Sec8 ist zum Vergleich in E) exemplarisch abgebildet. Eine Überlagerung von Sec6 und SI-YFP findet sich nur an der lateralen Membran (B, Pfeile). Intrazellulär (Sternchen); Zellkerne (blau); laterale Membran (pink) Maßstab: 20 μ m

3.6 Sec8 ist mit DRMs aus MDCK-SI-Zellen assoziiert

Der Transport der SI zur apikalen Membran in MDCK-Zellen verläuft über den *Lipid Raft*-abhängigen Transportweg (Alfalah *et al.*, 1999; Jacob *et al.*, 2000). Die zuvor durchgeführten Experimente zeigten eine Assoziation von Sec8 mit SI-haltigen Vesikeln in MDCK-Zellen. Es sollte zudem überprüft werden, ob Sec8 mit Detergenz resistenten Membranen (DRMs) aus MDCK-SI-Zellen assoziiert ist.

Für die Präparation von den DRMs aus MDCK-SI-Zellen wurde das Protokoll, wie unter Punkt 2.10.4 beschrieben, verwendet. Als Markerprotein für die DRM-Fractionen wurde Caveolin-1 verwendet. Caveolin-1 ist ein integrales Membranprotein, welches sich mit DRMs während des Transportes vom TGN zur Plasmamembran assoziiert (Parton und Simons, 2007). In Abbildung 3.7 A ist deutlich erkennbar, dass ein Teil von Sec8 in den Caveolin-1 positiven Fraktionen zu finden ist und folglich mit den DRMs assoziiert ist. Ein weiterer Anteil von Sec8 befindet sich in der Triton-X-100 löslichen, untersten Fraktion. Weiterhin ist noch einmal die Assoziation der komplex-glykosylierten SI (SI_c) mit den DRMs gezeigt. Für diese Experimente wurden MDCK-SI-Zellen verwendet, die sich im *steady state*-Zustand befanden. Das erklärt auch den relativ geringen Anteil von Caveolin-1 in den DRMs (Abb. 3.7 B), da auch Caveolin-1 miterfasst worden ist, welches sich noch im Syntheseapparat befand und folglich noch nicht mit den DRMs assoziiert war (Parton und Simons, 2007). Zur Kontrolle wurde das Experiment analog mit dem Detergenz Saponin durchgeführt. Saponin löst Triton-X-100 unlösliche DRMs. Während der Ultrazentrifugation nach Extraktion mit 1% Saponin bleibt somit der Aufstieg (*Floating*) der DRMs und der assoziierten Proteine im Saccharose-Stufengradienten aus. In Abbildung 3.7 C befinden sich Sec8 und Caveolin-1 in den unteren, Detergenz löslichen Fraktionen. Die SI ist in der Kontrolle nicht mehr gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Sec8 zu etwa 50% in DRMs aus MDCK-SI-Zellen zu finden ist.

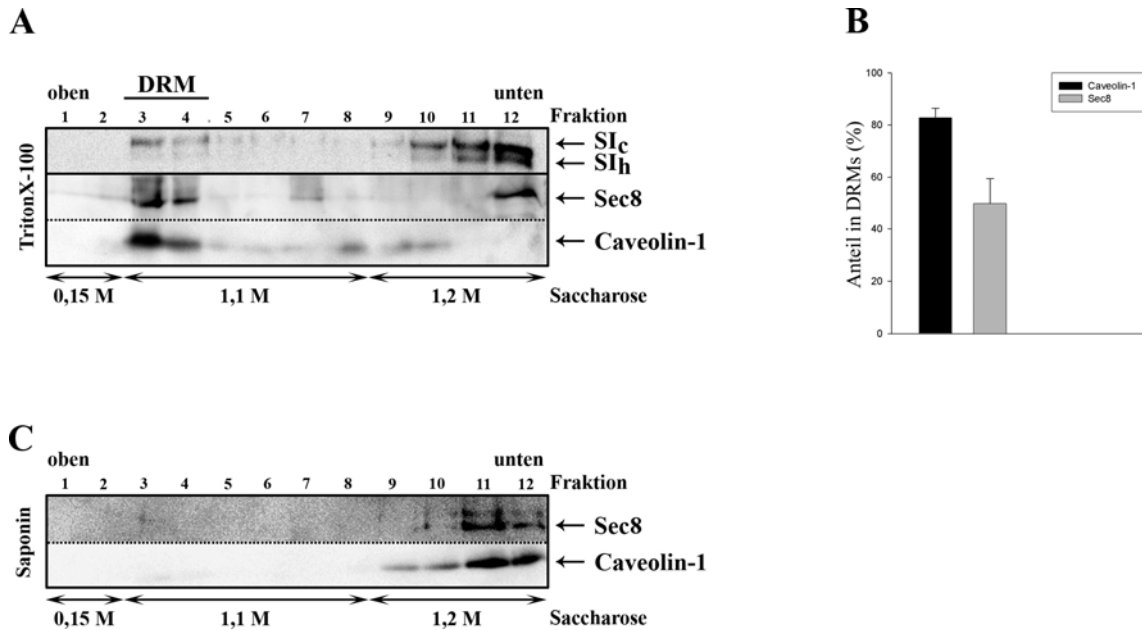


Abbildung 3.7: Sec8 ist mit DRMs aus MDCK-SI-Zellen assoziiert

A) bis C) Aus MDCK-SI-Zellen (*steady state*-Zustand) wurde zunächst die Membranfraktion isoliert und anschließend erfolgte die Extraktion mit 1% Triton-X-100 (A, B) oder 1% Saponin (C) in TNE-Puffer bei 4°C. Die Proben wurden nach 30 min mit 2,4 M Saccharose-Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt und mit 6 ml 1,1 M und 2 ml 0,15 M Saccharose-Lösung beschichtet. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Fraktionen 1-12 von oben nach unten zu je 1 ml abgenommen. Die Proteinfällung erfolgte direkt im Anschluss über eine TCA/Aceton-Fällung. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Western Blots wurden mit anti-Sec8 (14G1), anti-Caveolin-1 (C060) und anti-SI (HBB 3/705) inkubiert und entwickelt. In B) ist die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die SI ist nicht mit aufgeführt. (gestrichelte Linie: trennt verschiedene Bereiche eines Blots; durchgezogene Linie: trennt zwei Blots)

4. Diskussion

Der Exocyst-Komplex ist ein konservierter Multiproteinkomplex und spielt eine entscheidende Rolle sowohl im Transport polarisierter Zellen als auch in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Er fungiert als ein Vesikel-Bindungskomplex, der die Bindung und Spezifität des Vesikels vor der Verschmelzung mit der Plasmamembran sichert. Der Exocyst-Komplex scheint besonders in der späten Phase der Exocytose zu wirken und dient als eine Art Landmarke für ankommende Vesikel. Dabei sind unterschiedliche Untereinheiten des Komplexes mit verschiedenen Kompartimenten assoziiert, diese können als Ligand (am Vesikel) und als Rezeptor (an der Plasmamembran) verstanden werden.

In Nierenepithelzellen konnte eine Beteiligung des Komplexes im basolateralen Transport von LDLR (Grindstaff *et al.*, 1998) und AQP3 (Nejsum und Nelson, 2007) gezeigt werden. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte die Rolle der Exocyst-Untereinheiten Sec6, Sec8 und Exo70 im basolateralen und apikalen Recycling sowie in der Transzytose von der basolateralen zur apikalen Membran beschrieben werden (Oztan *et al.*, 2007). Daten für einen direkten Einfluss von Exocyst-Untereinheiten auf den apikalen Transport neu synthetisierter Proteine liegen für Nierenepithelzellen bisher noch nicht vor.

Die Rolle einzelner Exocyst-Komponenten im apikalen Transport konnte in *Drosophila melanogaster* (*D.melanogaster*) gezeigt werden. Mutationen in der Untereinheit Sec6 führen zu einer intrazellulären Akkumulation von Vesikeln und zu einer deutlichen Verminderung von apikal-lokalisierten Proteinen im Rhabdomer, einer speziellen Domäne in der apikalen Membran, die als Lichtsensor dient (Beronja *et al.*, 2005). In verschiedenen Entwicklungsstadien von *D.melanogaster* führen Mutationen von Sec6 zum Zelltod (Beronja *et al.*, 2005). Die Untereinheit Exo84 ist in bestimmten Entwicklungsstadien essentiell für die apikale Lokalisierung des Polarisationsproteins Crumbs und dient somit der Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Mutationen in Exo84 führen zu einer Akkumulation von apikal-lokalisierten Proteinen in Rab11-positiven REs (Blankenship *et al.*, 2007).

Die Untereinheit Sec6 wurde an SI-tragenden Vesikeln in MDCK-Zellen identifiziert. Die Daten aus *D.melanogaster* lassen vermuten, dass Sec6 im apikalen Transport der SI

eine mögliche Rolle spielen kann. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Bedeutung von Sec6 im apikalen Transport der SI näher untersucht werden.

4.1 Die Assoziation von Sec6/8 mit SI-haltigen Vesikeln

SI-tragende Vesikel lassen sich spezifisch aus MDCK-SI-YFP-Zellen isolieren und deren Proteinbestandteile mittels 2D-Gelelektrophorese und der anschließenden MALDI-TOF Analyse identifizieren. In der Vergangenheit wurde auf diese Weise Galektin-3 an LPH-tragenden Vesikeln gefunden und ein Einfluss von Galektin-3 auf den Transport der LPH konnte festgestellt werden (Delacour *et al.*, 2006). Sec6 wurde an SI-tragenden post-Golgi Vesikeln 20 min nach Verlassen des *trans*-Golgi Netzwerkes (TGNs) gefunden. In Western Blot Analysen war es jedoch nicht möglich den Antikörper gegen Sec6 (9H5) zu verwenden, da sich dieser Antikörper hier als nicht funktionstüchtig erwies. Sec8 ist ein möglicher Ersatz für Sec6 unter der Annahme, dass Sec6 direkt mit Sec8 interagiert und einen Teil-Komplex innerhalb des Exocyst-Komplexes bildet (Munson und Novick, 2006). Ein Sec8-Monomer konnte bei der Charakterisierung des Exocyst-Komplexes nicht gefunden werden (TerBush *et al.*, 1995).

Durch Western Blot Analysen konnte Sec8 nach einer Vesikel-IP gegen SI-YFP 20 min nach Verlassen des TGNs an SI-tragenden Vesikeln nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich in der Kontrollbande des Western Blots auch ein schwächeres Sec8-Signal, was darauf hindeutet, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine unspezifische Bindung von Sec8 an die verwendete Protein-A-Sepharose (PAS) stattfindet. Um während der Immunpräzipitation die Struktur des Vesikels mit seinen Komponenten zu erhalten, dürfen in die verwendeten Lösungen und Puffer keine Detergenzien zugegeben werden. Das Weglassen von Detergenzien kann vermehrt zu unspezifischen Bindungen führen. Dass Komponenten des Exocyst-Komplexes eine hohe Affinität zu Protein-A-Sepharose haben, wurde für Sec6 schon früher beobachtet (TerBush *et al.*, 1995). Für Sec8 wird eine unspezifische Bindung an Glutathion-S-Transferase (GST)-*Beads* beschrieben (Vega und Hsu, 2001).

Eine Vesikel-IP 20 min nach Verlassen des TGNs gegen Sec8-tragende Strukturen, zeigte eine Assoziation mit der SI. Besonders die Tatsache, dass es sich hierbei um die komplex-glykosylierte SI (SI_c) handelt, deutet auf eine Assoziation von Sec8 mit SI-haltigen post-Golgi Vesikeln hin. Auch hier findet sich in der Kontrolle eine

unspezifische Bindung von Sec8 an die PAS, nicht jedoch für die SI. Die durchgeführte Co-IP gegen Sec8 zeigte keine direkte Interaktion von Sec8 mit SI. Durch den Einsatz von Detergenzien trat keine unspezifische Bindung von Sec8 an PAS auf.

Diese Experimente, zusammen mit der MALDI-TOF Analyse, geben Hinweise auf eine Assoziation von Sec8 (und Sec6) mit SI-haltigen post-Golgi Vesikeln 20 min nach Verlassen des TGNs, ohne dass Sec8 direkt mit der SI interagiert.

4.2 Der Einfluss von Sec8 auf den apikalen Transport der SI

Ob der Exocyst-Komplex einen möglichen Einfluss auf den apikalen Transport der SI hat, sollten siRNA-Experimente klären. Für dieses Experiment wurde erneut Sec8 als Zielprotein gewählt. In den mit siRNA-behandelten Zellen kommt es weder zu einem Defizit im Transport der SI an die Oberfläche noch kommt es zu einer Fehlsortierung an die basolaterale Plasmamembran. Dieses Ergebnis kann mehrere Gründe haben. Der *Knockdown* von Sec8 ist nicht ausreichend und der verbleibende endogene Pool an Sec8 ist groß genug, um Transportvorgänge aufrecht zu erhalten. Dafür sprechen Daten aus früheren Veröffentlichungen, die belegen, dass der Exocyst-Komplex fest an die laterale Membran in MDCK-Zellen gebunden ist (Grindstaff *et al.*, 1998) und die Degradation des Komplexes in polaren MDCK-Zellen sehr langsam erfolgt (Kommunikation mit S. Hsu, Rutgers Universität, Piscataway, USA). Möglich wäre auch, dass eine Aufrechterhaltung der Funktion des Komplexes nicht direkt an Sec8 gekoppelt ist, da der Exocyst-Komplex aus insgesamt acht Untereinheiten aufgebaut ist und multiple Interaktionen zwischen den Untereinheiten bestehen. Ein Fehlen von Sec8 könnte möglicherweise kompensiert werden (Munson und Novick, 2006). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Komplex auf den apikalen Transport der SI keinen Einfluss hat und Störungen in der Funktion des Exocyst-Komplexes keine Auswirkungen zeigen. Dies konnte für den apikalen Transport von p75^{NTR} gezeigt werden. Eine Blockade von Sec8 durch spezifische Antikörper führte zu einer Verminderung des basolateralen Transportes von LDLR in MDCK-Zellen. Der apikale Transport von p75^{NTR} war nicht beeinflusst (Grindstaff *et al.*, 1998). Eine neuere Veröffentlichung zeigte die Notwendigkeit des Exocyst-Komplexes für den basolateralen Transport von AQP3 in MDCK-Zellen. Hingegen war der apikale Transport von AQP5 vom Exocyst-Komplex unabhängig (Nejsum und Nelson, 2007).

4.3 Die Lokalisation von Sec6/8 in COS-7-Zellen

Die verschiedenen Transportwege vom TGN zur Plasmamembran sind in unpolaren Zellen konserviert (Yoshimori *et al.*, 1996). COS-Zellen eignen sich aufgrund ihrer flachen Morphologie besonders gut zum Studieren von Transportprozessen, wie dies in der Vergangenheit häufig gezeigt werden konnte (Jacob und Naim 2001, Jacob *et al.*, 2004). Zum anderen zeigte sich in MDCK-Zellen ein diffuses, intrazelluläres Muster von Sec6 und Sec8, was die Interpretation einer möglichen vesikulären Assoziation mit SI-YFP-tragenden Vesikeln erschwert und wenig Aussagekraft verleiht.

COS-7-Zellen wurden verwendet, um eine mögliche Interaktion (Überlagerung) von SI-YFP-tragenden Vesikeln mit den Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8 darzustellen. Dazu wurde zum einen der *steady state*-Zustand betrachtet, in dem alle Stadien des Transportes vom TGN zur PM zu finden sind. Zum anderen wurde der Zustand nach einem 20°C TGN-Temperaturblock betrachtet. Weder im *steady state*-Zustand noch nach einem TGN-Temperaturblock findet sich eine eindeutige Überlagerung der beiden Signale von Sec6/8 mit SI-YFP (siehe Abb. 3.4 A, B und C).

Dies deutet darauf hin, dass die SI auf dem Weg vom TGN zur Plasmamembran kein Sec6/8-positives Kompartiment durchquert oder auf Höhe des TGNs mit der SI interagiert. Yeaman und Kollegen beschreiben eine Assoziation von Sec6/8 mit dem TGN in NRK-Zellen (Yeaman *et al.*, 2001), jedoch konnte diese Beobachtung in späteren Studien nicht bestätigt werden (Fölsch *et al.*, 2003, Oztan *et al.*, 2007). Es muss eher von einer Lokalisierung von Sec6 nahe dem TGN ausgegangen werden, wie z.B. dem *Recycling Endosome* (Zhang *et al.*, 2004).

In COS-7-Zellen kommt ausschließlich ein zytoplasmatischer Pool von Sec6 und Sec8 vor, der überwiegend perinukleär zu finden ist. Auffallend ist hierbei die deutlich vesikuläre und teils tubuläre Struktur, was auf eine subzelluläre Verteilung in Form eines oder mehrerer endosomaler Kompartimente hindeutet (siehe Abb. 3.5 und 3.6). Da weder Sec6 noch Sec8 über eine Membranbindungsdomäne oder über einen Lipidanker verfügen (Munson und Novick, 2006), müssen sie über andere Proteine an die Membran des Kompartimentes gebunden sein. In Hefezellen wird diese Verbindung über Sec4, eine Rab-GTPase, bewerkstelligt (Guo *et al.*, 1999a). Das Homolog zu Sec4 in tierischen Zellen ist Rab8 (Chavrier *et al.*, 1990; Huber *et al.*, 1993). Wie in Abbildung 3.5 B deutlich sichtbar, findet sich eine Überlagerung der Rab8-

positiven mit Sec6-positiven Strukturen in COS-7-Zellen. Weiterhin finden sich Überlagerungen von Sec6 mit Rab4- und Rab11-positiven Strukturen (Abb. 3.5 A und C). Die größte Übereinstimmung findet sich dabei mit Rab4-positiven Kompartimenten. Rab8 ist am ehesten dem RE zuzuordnen (Henry und Sheff, 2008). Rab4 markiert das *Early Endosome* und das *Recycling Endosome* (Schwartz *et al.*, 2007). Rab11 ist ein typischer Marker für das perinukleär gelegene *Recycling Endosome* und das TGN in unpolaren Zellen (Perret *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2007). Die Assoziation der Exocyst-Untereinheit Sec15 mit dem Rab11-positiven RE in COS-7-Zellen wurde bereits beschrieben (Zhang *et al.*, 2004). Wu und Kollegen konnten eine direkte Interaktion der C-terminalen Domäne von Sec15 mit Rab11 und Rab8 in deren aktiven, GTP-gebundenen Form nachweisen. Für Rab4 fand sich keine direkte Interaktion mit Sec15 (Wu *et al.*, 2005). Das lässt vermuten, dass die Exocyst-Untereinheit Sec6 über Sec15, welches mit bestimmten membrangebundenen Rab-GTPasen interagiert, an endosomale Membranen gebunden ist. Andere Rab-GTPasen, wie z.B. Rab4, kommen ebenfalls an bestimmten Endosomen vor, spielen für die direkte Bindung der Exocyst-Untereinheiten aber keine Rolle.

Somit kann die Lokalisation der Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8 am ehesten dem *Recycling Endosome* zugeordnet werden, da dieses positiv für alle drei verwendeten Rab-GTPasen ist. Ein weiterer Anteil von Sec6 und Sec8 wäre dem *Early Endosome* zuzuordnen, da die größte Übereinstimmung mit Rab4 beobachtet wurde. Unsere Arbeitsgruppe konnte für die SI zeigen, dass sie Rab4-, Rab8-, und Rab11-positive endosomale Kompartimente auf dem Weg zur Plasmamembran durchquert (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Die endosomalen Kompartimente, an denen sich Sec6 findet, sind ebenfalls positiv für Rab4, Rab8 und Rab11. Da sich keine Kolo-kalisation von SI mit Sec6 fand, muss von unterschiedlichen Kompartimenten oder unterschiedlichen Domänen eines Kompartimentes ausgegangen werden (Gruenberg, 2001; Thompson *et al.*, 2007). Dafür sprechen erste experimentelle Untersuchungen aus der AG Jacob. Fixierte COS-Zellen, die Rab4-CFP und SI-YFP exprimierten und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Sec6/8 erfolgte, wiesen zweifach positive Strukturen für Rab4 mit SI und Rab4 mit Sec6, aber keine dreifach positiven Strukturen auf.

4.4 Die Lokalisation von Sec6/8 in MDCK-SI-YFP-Zellen

Grindstaff und Kollegen konnten zeigen, dass sich der Exocyst-Komplex während der Ausbildung der Polarität von MDCK-Zellen von einem zytoplasmatischen Pool zu einem membranständigen Pool verschiebt (Grindstaff *et al.*, 1998). Diese Region kolokalisiert mit dem *Tight Junction* assoziierten Protein ZO-1. Dennoch verbleibt ein intrazellulärer Pool des Exocyst-Komplexes, der je nach verwendeten Antikörper detektiert werden kann (Yeaman *et al.*, 2004; Oztan *et al.*, 2007).

In Abbildung 3.6 erkennt man SI-haltige Strukturen, die mit dem Sec6-positiven Membranbereich in Kontakt treten. Es findet sich eine Überlagerung beider Fluoreszenzsignale. Ob es sich hierbei wirklich um SI-tragende Vesikel auf dem Weg zur apikalen Membran oder sich bereits um SI in der apikalen Membran handelt, kann nicht mit Gewissheit gesagt werden. Möglich wären beide Szenarien, da der Einbau der SI in die apikale Membran 20 min nach Verlassen des TGNs beginnt (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Aufgrund des zu geringen lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens kann nicht zwischen SI-tragenden Vesikeln in unmittelbarer Nähe zur Membran und SI in der Plasmamembran unterschieden werden. Erschwerend kommt hinzu, dass es sich bei dem Sec6-positiven Membranbereich, um einen Grenzbereich zwischen lateraler und apikaler Membran handelt. SI, die sich in der apikalen Membran befindet, grenzt unmittelbar an diesen Bereich und lässt sich lichtmikroskopisch nicht genau differenzieren.

Für Sec6 und Sec8 existieren verschiedene Antikörper. Die für die Mikroskopie überwiegend verwendeten Antikörper sind kommerziell erhältlich (siehe Tabelle 2.2). Die Antikörper unterscheiden sich u.a. in ihrer Fähigkeit, den membranständigen Pool des Exocyst-Komplexes zu binden (Yeaman *et al.*, 2004; Oztan *et al.*, 2007). Shu Hsu (Rutgers Universität, Piscataway, USA) stellte freundlicherweise Antikörper gegen Sec6 und Sec8 zur Verfügung, die den intrazellulären Pool der Exocyst-Untereinheiten in MDCK-Zellen detektiert. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Bild wie zuvor in COS-7-Zellen. Es findet sich keine Überlagerung der Fluoreszenzsignale von Sec6 und Sec8 mit SI-tragenden Vesikeln (Bilder nicht gezeigt).

Die einzige Überlagerung von Sec6 und Sec8 mit SI-YFP findet sich somit im Bereich der lateralen Membran in polaren MDCK-SI-YFP-Zellen.

4.5 Unterschiedliche Verteilung von Sec6/8 in COS- und polaren MDCK-Zellen

In der intrazellulären Verteilung von Sec6 und Sec8 in COS- und MDCK-Zellen erkennt man deutliche Unterschiede. MDCK-Zellen wurden allerdings nur im polaren Zustand betrachtet.

Warum findet sich Sec6/8 nicht an der Plasmamembran in COS-Zellen? Fölsch und Kollegen diskutieren eine Beteiligung des AP-1B-positiven *Recycling Endosomes* zur Rekrutierung von Exocyst-Untereinheiten an die Plasmamembran. Experimente mit LLC-PK1-Zellen (Nierenepithelzellen vom Schwein, denen die μ 1B-Untereinheit fehlt), zeigten für Sec8 und Exo70 ein diffuses, zytoplasmatisches Muster. Durch die Transfektion der μ 1B-Untereinheit in LLC-PK1-Zellen konnte die Membranständigkeit von Sec8 und Exo70 wiederhergestellt werden. Die beiden Exocyst-Untereinheiten fanden sich nach Transfektion der μ 1B-Untereinheit an endosomalen Kompartimenten und an der lateralen Plasmamembran (Fölsch *et al.*, 2003). COS-Zellen (Fibroblasten) sind keine Epithelzellen und exprimieren demzufolge nicht die μ 1B-Untereinheit (Ohno *et al.*, 1999; Fölsch *et al.*, 1999). Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz sein, da die AP-1B-abhängige Rekrutierung vom endosomalen Kompartiment zur Plasmamembran in COS-Zellen fehlt. Die Beobachtung von Fölsch und Kollegen erklärt aber nicht die Lokalisierung der Untereinheiten Sec6 und Sec8 am RE, da die endosomale Lokalisation von Sec8 und Exo70 in den μ 1B-defizienten LLC-PK1-Zellen ebenfalls gestört war.

Die Rekrutierung des Exocyst-Komplexes an die Plasmamembran scheint eng an die Anwesenheit von E-Cadherin gebunden zu sein. Yeaman und Kollegen konnten eine Assoziation von Sec8 und Exo70 mit E-Cadherin und Nectin-2 α in MDCK-Zellen zeigen (Yeaman *et al.*, 2004). Die Expression von E-Cadherin oder Nectin-2 α in Fibroblasten reichte für die Rekrutierung von Sec8 an die Plasmamembran allein nicht aus. Allerdings führte die gleichzeitige Expression beider Proteine zu einer Rekrutierung von Sec8 an die Plasmamembran in unpolaren Fibroblasten (Yeaman *et al.*, 2004). Direkt nach der Ausbildung der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte in MDCK-Zellen kommt es an diesen Kontakten zu einer Akkumulation von Sec8 und Sec6 sowie von Syntaxin-4. Die initiale Rekrutierung von Sec8 und Sec6 an die Plasmamembran ist dabei unabhängig vom Mikrotubuli-Zytoskelett (Nejsum und Nelson, 2007). Eine weitere Veröffentlichung zeigt, dass in MDCK-Zellen eine Abnahme der Konzentration

von PALS-1, ein TJ assoziiertes Gerüstprotein, die Rekrutierung von E-Cadherin an die Plasmamembran hemmt. Desweiteren zeigt sich eine fehlende Rekrutierung von Sec8 an die laterale Plasmamembran. Die Lokalisierung von E-Cadherin und Sec8 kann durch Transfektion von PALS-1 wiederhergestellt werden (Wang *et al.*, 2007). Eine Überexpression von RalA, ein Regulator des Exocyst-Komplexes in Epithelzellen, führt zu einem gesteigerten Transport von E-Cadherin an die basolaterale Plasmamembran. Die apikale Transportrate von gp135 war nicht erhöht (Shipitsin und Feig, 2004). Der Transport von E-Cadherin vom TGN zur Plasmamembran verläuft sowohl in unpolaren als auch in polaren Zellen über das RE (Bryant und Stow, 2004; Desclozeaux *et al.*, 2008). In *D.melanogaster* ist die Rekrutierung von *drosophila epithelial* (DE)-Cadherin an die laterale Membran abhängig von Sec5, Sec6 und Sec15. Mutationen in diesen Exocyst-Komponenten führen zur Akkumulation von DE-Cadherin im Rab11-positiven *Recycling Endosome* (Langevin *et al.*, 2005)

Folgendes Szenario wäre denkbar. Die feste Interaktion der E-Cadherine sich benachbarter Zellen, wie dies in Epithelzellen bei Zell-Zell-Kontakten der Fall ist, bildet eine zytoplasmatisch gelegene Plattform, die die Rekrutierung von Exocyst-Untereinheiten aus dem Zytosol erlaubt. Die Annahme beruht auf der Tatsache, dass sich in vereinzelt wachsenden MDCK-Zellen E-Cadherin bereits in der Plasmamembran befindet (Adams *et al.*, 1998), die Rekrutierung der Exocyst-Untereinheiten aber erst nach oder während der Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte geschieht (Nejsum und Nelson, 2007). Nach der initialen Exocyst-Rekrutierung kann es zu einer stabilen Verankerung von Exocyst-Untereinheiten an der Membran kommen. Exo70 kann über die Interaktion mit PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ an die Membran gebunden werden (Liu *et al.*, 2007). Denkbar wäre eine Interaktion einzelner Exocyst-Untereinheiten mit Proteinen der Zell-Zell-Kontakte, wie z.B. über PDZ (PSD95/DLG/ZO-1)-Domänen (Sans *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2006). Die Aufrechterhaltung des E-Cadherin Pools an den Zell-Zell-Kontakten muss durch einen gerichteten, vesikulären Transport gewährleistet sein. Exocyst-Untereinheiten könnten mit E-Cadherin haltigen Vesikeln vom RE ausgehend assoziiert sein und stellen die Bindung an die mit Exo70 markierten Zell-Zell-Kontaktstellen der Plasmamembran sicher. Die fehlende Ausbildung fester Zell-Zell-Kontakte zwischen COS-Zellen könnte das Fehlen von Exocyst-Untereinheiten an

der Plasmamembran erklären, da die hierfür funktional notwendigen Bereiche nicht oder unzureichend ausgebildet werden.

4.6 Die Assoziation von Sec8 mit DRMs

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die SI über einen *Lipid Raft*-abhängigen Weg zur apikalen Seite der Membran transportiert wird (Alfalah *et al.*, 1999; Jacob *et al.*, 2000). Geht man von dem Konzept der *Lipid Raft*-Plattformen aus, müssten auch beteiligte Proteine mit *Lipid Raft*-Mikrodomänen assoziiert sein. Es erfolgte daher eine Überprüfung, ob der Exocyst-Komplex in MDCK-SI-Zellen auch in DRMs zu finden ist. In Abbildung 3.7 ist deutlich erkennbar, dass die Exocyst-Untereinheit Sec8 circa zu 50% mit DRMs assoziiert ist. Diese Daten decken sich mit einer kürzlich erschienen Veröffentlichung, die Proteine in Nierenepithelzellen auf ihre DRM-Assoziation hin untersuchten (Yu *et al.*, 2008). Wo diese Assoziation geschieht, ob an der lateralen Plasmamembran oder an vesikulären Strukturen, kann hiermit nicht beantwortet werden. Ebenso bleibt offen, wie diese Assoziation ermöglicht wird, da die Exocyst-Untereinheiten über keine Transmembrandomäne oder einen Lipidanker verfügen. Denkbar wäre eine Assoziation über Protein-Protein-Interaktionen, wie dies in Oligodendrozyten für Sec8 diskutiert wird. Sec8 ist in Oligodendrozyten mit dem *Lipid Raft*-assoziierten Transmembranprotein Claudin-11 verbunden (Anitei *et al.*, 2006). In Adipozyten führt der Insulinstimulus zur Rekrutierung von Exo70, Sec6 und Sec8 in DRMs, wodurch der Glukose-Transporter GLUT4 an die Plasmamembran transportiert wird. Die Bindung an die DRMs wird dabei über die kleine GTPase TC10 vermittelt, die direkt mit Exo70 interagiert (Inoue *et al.*, 2006). In MDCK-Zellen wäre eine Verbindung mit RalA/RalB sowie mit Rab11 denkbar, welche mit DRMs in Nierenepithelzellen assoziiert sind (Yu *et al.*, 2008). RalA und RalB könnten den Exocyst-Komplex indirekt über Sec5 und Exo84 mit den DRMs assoziieren (Wu *et al.*, 2008). Rab11 könnte Exocyst-Untereinheiten über die direkte Interaktion mit Sec15 an die DRMs binden (Wu *et al.*, 2005; Oztan *et al.*, 2007).

4.7 Schlussfolgerung

Durch die Eigenschaft von Sec6 an Protein-A-Sepharose unspezifisch zu binden (TerBush *et al.*, 1995), könnte Sec6 bei der MALDI-TOF Analyse von Bestandteilen SI-haltiger post-Golgi Vesikel (20 min TGN-Release) unspezifisch nachgewiesen worden sein. Die durchgeführten Immunoblots gegen Sec8, nach analog durchgeführten Vesikel-IPs gegen SI, können diesen Punkt nicht gänzlich ausschließen, da auch Sec8 eine hohe Affinität zur Protein-A-Sepharose zeigt und unspezifisch bindet. Hier kann nur über die unterschiedliche Signalintensität der durchgeführten Immunoblots gegen Sec8 für eine Assoziation von Sec8 mit SI-haltigen Vesikeln argumentiert werden. Umgekehrt zeigten die durchgeführten Vesikel-IPs gegen Sec8 eine Assoziation mit der komplex-glykosylierten Form der SI (SI_c), was wiederum für eine Assoziation von Sec8 mit SI-haltigen post-Golgi Vesikeln spricht. Kritisch sei hier anzumerken, dass bei diesen Experimenten große Plasmamembranbereiche isoliert worden sein könnten, die die SI_c enthalten, ohne dass beide Proteine einen Einfluss aufeinander hätten. Gerade stabil-transfizierte Zelllinien mit einer hohen Proteinexpression und die Abwesenheit von Detergenzien in den verwendeten Puffern, begünstigen diesen Umstand. Die Tatsache, dass Sec8 zum Teil mit DRMs assoziiert ist, spricht im Zusammenhang mit den anderen Experimenten für eine räumlich engere Interaktion der *Lipid Raft*-abhängigen SI mit Sec8. Möglich wäre eine Assoziation von SI mit Sec6 und Sec8 an der lateralen Plasmamembran in unmittelbarer Nähe zu den *Tight Junctions*, worauf die mikroskopischen Untersuchungen an MDCK-SI-YFP-Zellen hindeuten. An anderer Stelle, weder in MDCK- noch in COS-Zellen, fand sich keine eindeutige Kolo-kalisation der untersuchten Proteine.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass eine Interaktion von Exocyst-Bestandteilen mit SI-haltigen Vesikeln in polaren MDCK-Zellen an der lateralen Membran stattfinden kann. Dabei scheint die Exocyst-Untereinheit Sec8 für den Transport der SI an die apikale Oberfläche nicht entscheidend zu sein, da siRNA Experimente gegen Sec8 keinen Effekt auf den apikalen Transport der SI zeigten. Diese Daten decken sich mit früheren Publikationen, in denen der Exocyst keinen Einfluss auf den Transport von apikal lokalisierten Proteinen in Nierenepithelzellen hat (Grindstaff *et al.*, 1998; Nejsund und Nelson, 2007).

Hypothetisch wäre folgendes Szenario möglich: SI-haltige post-Golgi Vesikel gelangen zunächst über einen Mikrotubuli-abhängigen Transport in die Nähe der lateralen Membran. Nach einer transienten Interaktion mit dem Exocyst-Komplex könnten die Vesikel weiter über einen peripheren Aktin-abhängigen Transport zur apikalen Membran gelangen. Der Transport der SI ist zunächst an Mikrotubulifilamente gebunden und wechselt peripher auf Aktinfilamente (Jacob *et al.*, 2003). Untereinheiten des Exocyst-Komplexes können mit Mikrotubuli (Vega und Hsu, 2001) und mit dem Arp2/3-Komplex, ein Aktinnukleationskomplex, interagieren (Zuo *et al.*, 2006). Der Exocyst interagiert außerdem direkt mit dem IQGAP1 Protein (Rittmeyer *et al.*, 2008). IQGAP1 befindet sich an den Zell-Zell-Kontakten in MDCK-Zellen (Kuroda *et al.*, 1996). Es interagiert mit beiden Aktinnukleations-Komplexen, dem Arp2/3 Komplex und den Forminen (Brandt und Grosse, 2007). Desweiteren wird eine Assoziation von IQGAP1 mit Mikrotubulifilamenten über das Protein CLIP170 beschrieben (Fukata *et al.*, 2002). Es wäre somit denkbar, dass an der lateralen Membran eine Übergabe des Vesikels von Mikrotubuli auf Aktinfilamente stattfindet. Eine transiente Bindung SI-haltiger Vesikel könnte durch den Exocyst-Komplex vereinfacht werden, nicht aber zwingend notwendig sein. Möglich ist auch eine indirekte Interaktion über ein Konglomerat an Proteinen, ohne gegenseitig Einfluss aufeinander zu nehmen.

4.8 Ausblick

Um genauere Daten über die Interaktion des Exocyst-Komplexes mit SI-haltigen post-Golgi Vesikeln zu bekommen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen sollten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von polaren MDCK-SI-YFP-Zellen ergänzt werden, um eine mögliche Interaktion von SI-tragenden Vesikeln mit Exocyst-Untereinheiten an der lateralen Membran näher zu untersuchen. Mit diesen Aufnahmen sollte zwischen SI-tragenden Vesikeln und SI in der apikalen Plasmamembran unterschieden werden können. Erst dann können genauere Aussagen in Bezug auf die Interaktion von SI-tragenden Vesikeln mit Exocyst-Untereinheiten in diesem Bereich der Zelle gemacht werden. Für die Vesikel-IPs bleibt das Problem der unspezifischen Bindung von Sec8 weiterhin bestehen. Man könnte auf andere Exocyst-Untereinheiten ausweichen, in der Hoffnung, dass diese nicht unspezifisch an Protein-A-Sepharose binden. Interessant

wären dabei Sec15 und Exo70. Sec15 interagiert mit Rab-GTPasen und ist an der Bindung anderer Exocyst-Untereinheiten an vesikuläre Strukturen oder endosomale Kompartimente beteiligt. Exo70 verankert den Exocyst-Komplex an der Plasmamembran. In Bezug auf die siRNA-Experimente wäre es sinnvoll, Exocyst-Untereinheiten als Zielproteine zu wählen, die mit regulatorischen Proteinen interagieren (Sec5 und Exo84) oder an der Membranbindung (Exo70) beteiligt sind. Ebenfalls denkbar wäre, regulatorische Proteine des Exocyst-Komplexes, wie z.B. RalA, durch spezifische siRNA zu vermindern und die Auswirkungen auf den Transport der SI zu untersuchen. Der *Knockdown* regulatorischer Proteine in MDCK-Zellen wäre höchstwahrscheinlich effizienter als der *Knockdown* einzelner Exocyst-Komponenten. Außerdem könnte mit Hilfe einer Mikroinjektions-Apparatur die Funktion des Exocyst-Komplexes durch injizierte Antikörper gegen spezifische Untereinheiten blockiert und deren Effekt auf den Transport der SI untersucht werden.

Eine weitere interessante und grundlegende Fragestellung ist, wie die Lokalisation des Exocyst-Komplexes in polaren MDCK-Zellen in der Nähe der *Tight Junctions* gewährleistet wird. Diese Fragestellung wurde bisher nur unzureichend untersucht und die gewonnenen Daten erklären keineswegs die charakteristische Lokalisation des Exocyst-Komplexes in polaren MDCK-Zellen. Durch Immunpräzipitations-Experimente können Exocyst-Komponenten isoliert und mit Hilfe der MALDI-TOF Analyse potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Die Rolle der identifizierten Proteine kann dann in Bezug auf die Lokalisation des Exocyst-Komplexes weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Epithelzellen besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung und Aufrechterhaltung funktional unterschiedlicher Bereiche der Plasmamembran. Die apikale Membran ist zum Lumen (Umwelt) gerichtet, die basolaterale Membran zur Basalmembran und zu den benachbarten Epithelzellen. Dabei unterscheiden sich die apikale und die basolaterale Membran in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung. Diese unterschiedlich aufgebauten Bereiche der Plasmamembran werden durch die *Tight Junctions* voneinander getrennt und durch einen selektiven Transport aufrechterhalten. Für den selektiven Transport spielen verschiedene Sortiersignale eine entscheidende Rolle, die die Proteine in entsprechende Transportvesikel sortieren. Im basolateralen Transport sind es vor allem spezifische Aminosäuresequenzen im zytoplasmatisch gelegenen Anteil der Proteine. Apikale Sortiersignale sind vielfältiger und umfassen N- und O-Glykane, GPI-Anker und Transmembrandomänen. Diese apikalen Sortiersignale beeinflussen, ob apikal-lokalisierte und -sezernierte Proteine einen *Lipid Raft*-abhängigen oder einen *Lipid Raft*-unabhängigen Weg zur apikalen Membran durchlaufen. Als *Lipid Rafts* werden spezielle Membranmikrodomänen in Zellmembranen angesehen. Auf den Weg gebrachte Transportvesikel mit der zuvor selektiv zusammengestellten Fracht, binden zunächst an die Zielmembran, bevor sie mit dieser verschmelzen. Diese Bindung wird von Vesikel-Bindungskomplexen vermittelt. Einer dieser Bindungskomplexe ist der Exocyst-Komplex, ein Multiproteinkomplex bestehend aus acht Untereinheiten. Exocyst-Untereinheiten befinden sich dabei sowohl am Transportvesikel (Ligand) als auch an der Zielmembran (Rezeptor). Ligand und Rezeptor vermitteln die spezifische Bindung, bevor die Verschmelzung stattfinden kann. Die Verschmelzung von Vesikel und Membran wird über sog. *SNARE*-Komplexe vermittelt. In polaren MDCK-Zellen (Nierenepithelzellen) befindet sich der überwiegende Teil des Exocyst-Komplexes an der lateralen Membran, in unmittelbarer Nähe zu den *Tight Junctions*. Eine wichtige Rolle des Exocyst-Komplexes im gerichteten Transport konnte für einige basolateral lokalisierte Proteine in MDCK-Zellen bereits gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Dissertation, wurde die Rolle bestimmter Exocyst-Untereinheiten, besonders von Sec8, im apikalen Transport des Modellproteins Saccharase-Isomaltase

(SI) in MDCK-Zellen untersucht. Ausgangspunkt war die Identifizierung der Untereinheit Sec6 an SI-tragenden, apikalen Transportvesikeln 20 min nach Verlassen des *trans*-Golgi Netzwerkes (TGNs) in polaren MDCK-SI-YFP-Zellen. Immunpräzipitations-Experimente konnten die Assoziation einer weiteren Exocyst-Untereinheit, Sec8, mit SI-tragenden Vesikeln zeigen. Dabei interagiert Sec8 indirekt mit SI. Eine Verminderung der endogenen Sec8-Konzentration durch spezifische siRNA zeigte keinen Einfluss auf den apikalen Transport der SI in MDCK-SI-Zellen. Mikroskopische Untersuchungen an MDCK-SI-YFP-Zellen lassen auf eine Interaktion von Sec6 und Sec8 mit SI-tragenden Vesikeln an der lateralen Membran schließen. Dieser Membranbereich entspricht der Hauptlokalisation des Exocyst-Komplexes in polaren MDCK-Zellen und befindet sich in unmittelbarer Nähe der *Tight Junctions*. Mikroskopische Untersuchungen an unpolaren COS-Zellen (Fibroblasten) konnten keine Kolo-kalisation von SI-tragenden Vesikeln mit den Exocyst-Untereinheiten Sec6 und Sec8 zeigen. Sec6 und Sec8 sind in COS-Zellen überwiegend an *Recycling Endosomes* lokalisiert. Die SI wird über einen *Lipid Raft*-abhängigen Weg zur apikalen Membran transportiert. Eine Isolation dieser speziellen Membranmikrodomänen ergab, dass die Untereinheit Sec8 ebenfalls mit sog. Detergenz-resistenten Membranen (DRMs) aus MDCK-SI-Zellen assoziiert ist.

Die im Rahmen der Doktorarbeit gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Exocyst-Untereinheit Sec8 keinen Einfluss auf den apikalen Transport der SI an die Zelloberfläche in MDCK-Zellen hat. Zu diesem Zeitpunkt kann keine Aussage darüber getroffen werden, wo die Assoziation von Sec8 mit DRMs zustande kommt. Weitere Untersuchungen sind dafür notwendig.

5.2 Summary

Epithelial cells are able to form and sustain different functional areas in their plasma membrane. The apical membrane faces the lumen (environment) and the basolateral membrane faces the basement membrane and neighbouring cells. The two membrane domains differ in their protein and lipid composition. These different types of membranes are separated by tight junctions and sustained by a selective transport. Different sorting signals are important for the selective transport and for the sorting of proteins in respective transport vesicles. For the basolateral transport specific amino acid sequences in the cytoplasmic part of the protein are important. Apical sequences are more complex and consist of N- and O-glycans, GPI-anchors, and transmembrane domains. These apical sorting signals bias if apical-localized and -secreted proteins take the *lipid raft* associated or the non-*lipid raft* associated route to the apical membrane. *Lipid rafts* are special membrane microdomains within cell membranes. Transport vesicles with their selective cargo bind to the target membrane on the route to the cell surface before fusion occurs. Vesicle binding to the target membrane is arranged by tethering complexes. One of these tethering complexes is the so-called “Exocyst” complex, a multiprotein complex consisting of eight subunits. Exocyst subunits can be found on the transport vesicle (ligand) as well as on the target membrane (receptor). Ligand and receptor arrange the binding before fusion occurs. The fusion of the vesicle and the membrane is then triggered by *SNARE*-complexes. In polarized MDCK cells (kidney epithelial cells) the main part of the Exocyst complex is located on the lateral membrane near the tight junctions. A decisive role of the Exocyst complex in protein trafficking could previously be shown for some basolateral localized proteins in MDCK cells.

Within this dissertation, the role of some Exocyst subunits, especially for Sec8, in the apical transport of the model protein sucrase-isomaltase (SI) in MDCK cells were investigated. The starting point was the identification of the Exocyst subunit Sec6 on SI carrying, apical transport vesicles twenty minutes after the release from *trans*-Golgi network in polarized MDCK-SI-YFP cells. Immunoprecipitation experiments could show an association of another Exocyst subunit, Sec8, with SI carrying vesicles. Sec8 interacts indirectly with SI. Reduction of endogenous Sec8 concentration by specific siRNA shows no effect on the apical transport of SI in MDCK-SI cells. Microscopic

investigations in MDCK-SI-YFP cells suggest an interaction of Sec6 and Sec8 with SI carrying vesicles on the lateral membrane. This membrane area corresponds to the main localization of the Exocyst complex in polarized MDCK cells and resides near the tight junctions. Microscopic investigations in unpolarized COS cells (fibroblasts) shows no colocalization of SI carrying vesicles with the Exocyst subunits Sec6 and Sec8. Sec6 and Sec8 are localized in COS cells predominantly on recycling endosomes. SI is transported on a *lipid raft*-dependent route to the apical membrane. Isolation of these special membrane microdomains shows that the subunit Sec8 is also associated with detergent resistant membranes (DRMs) in MDCK-SI cells.

The data obtained within this dissertation suggest, that the Exocyst subunit Sec8 has no influence on the apical transport of SI in MDCK cells. At this time, no conclusion can be made where the association of Sec8 with DRMs occurs. Further investigations are necessary in this regard.

6. Literaturverzeichnis

1. Adamo JE, Rossi G, Brennwald P: **The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity.** *Mol.Biol.Cell* 1999, **10**:4121-4133.
2. Adams CL, Chen YT, Smith SJ, Nelson WJ: **Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein.** *J.Cell Biol.* 1998, **142**:1105-1119.
3. Alfalah M, Jacob R, Preuss U, Zimmer KP, Naim H, Naim HY: **O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts.** *Curr.Biol.* 1999, **9**:593-596.
4. Ang AL, Taguchi T, Francis S, Folsch H, Murrells LJ, Pypaert M, Warren G, Mellman I: **Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells.** *J.Cell Biol.* 2004, **167**:531-543.
5. Anitei M, Ifrim M, Ewart MA, Cowan AE, Carson JH, Bansal R, Pfeiffer SE: **A role for Sec8 in oligodendrocyte morphological differentiation.** *J.Cell Sci.* 2006, **119**:807-818.
6. Au JS, Puri C, Ihrke G, Kendrick-Jones J, Buss F: **Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells.** *J.Cell Biol.* 2007, **177**:103-114.
7. Bao Y, Lopez JA, James DE, Hunziker W: **Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:324-331.
8. Bartles JR, Feracci HM, Stieger B, Hubbard AL: **Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation.** *J.Cell Biol.* 1987, **105**:1241-1251.
9. Behnia R, Munro S: **Organelle identity and the signposts for membrane traffic.** *Nature* 2005, **438**:597-604.
10. Benting JH, Rietveld AG, Simons K: **N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells.** *J.Cell Biol.* 1999, **146**:313-320.
11. Beronja S, Laprise P, Papoulas O, Pellikka M, Sisson J, Tepass U: **Essential function of Drosophila Sec6 in apical exocytosis of epithelial photoreceptor cells.** *J.Cell Biol.* 2005, **169**:635-646.
12. Blankenship JT, Fuller MT, Zallen JA: **The Drosophila homolog of the Exo84 exocyst subunit promotes apical epithelial identity.** *J.Cell Sci.* 2007, **120**:3099-3110.
13. Bonifacino JS, Glick BS: **The mechanisms of vesicle budding and fusion.** *Cell* 2004, **116**:153-166.
14. Bonifacino JS: **The GGA proteins: adaptors on the move.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2004, **5**:23-32.
15. Bowser R, Muller H, Govindan B, Novick P: **Sec8p and Sec15p are components of a plasma membrane-associated 19.5S particle that may function downstream of Sec4p to control exocytosis.** *J.Cell Biol.* 1992, **118**:1041-1056.

16. Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P: **Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p.** *J.Cell Biol.* 2004, **167**:889-901.
17. Brandt DT, Grosse R: **Get to grips: steering local actin dynamics with IQGAPs.** *EMBO Rep.* 2007, **8**:1019-1023.
18. Brown DA, Rose JK: **Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.** *Cell* 1992, **68**:533-544.
19. Bryant DM, Stow JL: **The ins and outs of E-cadherin trafficking.** *Trends Cell Biol.* 2004, **14**:427-434.
20. Cancino J, Torrealba C, Soza A, Yuseff MI, Gravotta D, Henklein P, Rodriguez-Boulan E, Gonzalez A: **Antibody to AP1B adaptor blocks biosynthetic and recycling routes of basolateral proteins at recycling endosomes.** *Mol.Biol.Cell* 2007, **18**:4872-4884.
21. Casanova JE, Apodaca G, Mostov KE: **An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor.** *Cell* 1991, **66**:65-75.
22. Catino MA, Paladino S, Tivodar S, Pocard T, Zurzolo C: **N- and O- glycans are not directly involved in the oligomerization and apical sorting of GPI proteins.** *Traffic.* 2008.
23. Chavrier P, Vingron M, Sander C, Simons K, Zerial M: **Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line.** *Mol.Cell Biol.* 1990, **10**:6578-6585.
24. Chen XW, Leto D, Chiang SH, Wang Q, Saltiel AR: **Activation of RalA is required for insulin-stimulated Glut4 trafficking to the plasma membrane via the exocyst and the motor protein Myo1c.** *Dev.Cell* 2007, **13**:391-404.
25. Cheong KH, Zacchetti D, Schneeberger EE, Simons K: **VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999, **96**:6241-6248.
26. Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, Musch A: **Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton.** *J.Cell Biol.* 2004, **164**:717-727.
27. Cramm-Behrens CI, Dienst M, Jacob R: **Apical Cargo Traverses Endosomal Compartments on the Passage to the Cell Surface.** *Traffic.* 2008.
28. De Matteis MA, Luini A: **Exiting the Golgi complex.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2008, **9**:273-284.
29. Deborde S, Perret E, Gravotta D, Deora A, Salvarezza S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E: **Clathrin is a key regulator of basolateral polarity.** *Nature* 2008, **452**:719-723.
30. Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, Andre S, Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G: **Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells.** *J.Cell Biol.* 2005, **169**:491-501.
31. Delacour D, Jacob R: **Apical protein transport.** *Cell Mol.Life Sci.* 2006, **63**:2491-2505.

32. Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R: **Requirement for galectin-3 in apical protein sorting.** *Curr.Biol.* 2006, **16**:408-414.
33. Delacour D, Greb C, Koch A, Salomonsson E, Leffler H, Le Bivic A, Jacob R: **Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering.** *Traffic.* 2007, **8**:379-388.
34. Desclozeaux M, Venturato J, Wylie FG, Kay JG, Joseph SR, Le HT, Stow JL: **Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis.** *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2008, **295**:C545-C556.
35. Edidin M: **Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2003, **4**:414-418.
36. Finger FP, Hughes TE, Novick P: **Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast.** *Cell* 1998, **92**:559-571.
37. Fölsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I: **A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells.** *Cell* 1999, **99**:189-198.
38. Fölsch H, Pypaert M, Maday S, Pelletier L, Mellman I: **The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains.** *J.Cell Biol.* 2003, **163**:351-362.
39. Fölsch H: **The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells.** *Trends Cell Biol.* 2005, **15**:222-228.
40. Fölsch H: **Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells.** *Curr.Opin.Cell Biol.* 2008, **20**:208-213.
41. Fujita M, Matsui H, Nagano K, Nakao M: **Asymmetric distribution of ouabain-sensitive ATPase activity in rat intestinal mucosa.** *Biochim.Biophys.Acta* 1971, **233**:404-408.
42. Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F, Kaibuchi K: **Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170.** *Cell* 2002, **109**:873-885.
43. Futter CE, Connolly CN, Cutler DF, Hopkins CR: **Newly synthesized transferrin receptors can be detected in the endosome before they appear on the cell surface.** *J.Biol.Chem.* 1995, **270**:10999-11003.
44. Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, Martin-Belmonte F, Kierbel A, Engel J, Mostov K: **Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells.** *Nat.Cell Biol.* 2006, **8**:963-970.
45. Gerges NZ, Backos DS, Rupasinghe CN, Spaller MR, Esteban JA: **Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane.** *EMBO J.* 2006, **25**:1623-1634.
46. Gluzman Y: **SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.** *Cell* 1981, **23**:175-182.

47. Gravotta D, Deora A, Perret E, Oyanadel C, Soza A, Schreiner R, Gonzalez A, Rodriguez-Boulán E: **AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007, **104**:1564-1569.
48. Grindstaff KK, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu SC, Rodriguez-Boulán E, Scheller RH, Nelson WJ: **Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells.** *Cell* 1998, **93**:731-740.
49. Gruenberg J: **The endocytic pathway: a mosaic of domains.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2001, **2**:721-730.
50. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S: **The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center.** *Biochim.Biophys.Acta* 2008, **1778**:601-613.
51. Guo W, Roth D, Walch-Solimena C, Novick P: **The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis.** *EMBO J.* 1999a, **18**:1071-1080.
52. Guo W, Grant A, Novick P: **Exo84p is an exocyst protein essential for secretion.** *J.Biol.Chem.* 1999b, **274**:23558-23564.
53. Guo W, Tamanoi F, Novick P: **Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase.** *Nat.Cell Biol.* 2001, **3**:353-360.
54. Hancock JF: **Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2006, **7**:456-462.
55. Hansson GC, Simons K, van Meer G: **Two strains of the Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line have distinct glycosphingolipid compositions.** *EMBO J.* 1986, **5**:483-489.
56. Hanzal-Bayer MF, Hancock JF: **Lipid rafts and membrane traffic.** *FEBS Lett.* 2007, **581**:2098-2104.
57. Hartsock A, Nelson WJ: **Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton.** *Biochim.Biophys.Acta* 2008, **1778**:660-669.
58. Hazuka CD, Foletti DL, Hsu SC, Kee Y, Hopf FW, Scheller RH: **The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains.** *J.Neurosci.* 1999, **19**:1324-1334.
59. He B, Xi F, Zhang X, Zhang J, Guo W: **Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane.** *EMBO J.* 2007, **26**:4053-4065.
60. Heine M, Cramm-Behrens CI, Ansari A, Chu HP, Ryazanov AG, Naim HY, Jacob R: **Alpha-kinase 1, a new component in apical protein transport.** *J.Biol.Chem.* 2005, **280**:25637-25643.
61. Helms JB, Zurzolo C: **Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking.** *Traffic.* 2004, **5**:247-254.
62. Henry L, Sheff DR: **Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome.** *Mol.Biol.Cell* 2008, **19**:2059-2068.

63. Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL, Scheller RH: **Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex.** *Trends Cell Biol.* 1999, **9**:150-153.
64. Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K: **Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane.** *J.Cell Biol.* 1993, **123**:35-45.
65. Hunziker W, Spiess M, Semenza G, Lodish HF: **The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane-orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein.** *Cell* 1986, **46**:227-234.
66. Hunziker W, Harter C, Matter K, Mellman I: **Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant.** *Cell* 1991, **66**:907-920.
67. Ihrke G, Bruns JR, Luzio JP, Weisz OA: **Competing sorting signals guide endolyn along a novel route to lysosomes in MDCK cells.** *EMBO J.* 2001, **20**:6256-6264.
68. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S: **Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells.** *J.Cell Biol.* 2005, **171**:939-945.
69. Inoue M, Chang L, Hwang J, Chiang SH, Saltiel AR: **The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin.** *Nature* 2003, **422**:629-633.
70. Inoue M, Chiang SH, Chang L, Chen XW, Saltiel AR: **Compartmentalization of the exocyst complex in lipid rafts controls Glut4 vesicle tethering.** *Mol.Biol.Cell* 2006, **17**:2303-2311.
71. Jacob R, Preuss U, Panzer P, Alfalah M, Quack S, Roth MG, Naim H, Naim HY: **Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin.** *J.Biol.Chem.* 1999, **274**:8061-8067.
72. Jacob R, Alfalah M, Grunberg J, Obendorf M, Naim HY: **Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein.** *J.Biol.Chem.* 2000, **275**:6566-6572.
73. Jacob R, Naim HY: **Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers.** *Curr.Biol.* 2001, **11**:1444-1450.
74. Jacob R, Heine M, Alfalah M, Naim HY: **Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells.** *Curr.Biol.* 2003, **13**:607-612.
75. Jacob R, Heine M, Eikemeyer J, Frerker N, Zimmer KP, Rescher U, Gerke V, Naim HY: **Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:3680-3684.
76. Jaulin F, Xue X, Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G: **Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells.** *Dev.Cell* 2007, **13**:511-522.
77. Kahya N, Brown DA, Schwille P: **Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles.** *Biochemistry* 2005, **44**:7479-7489.
78. Keller P, Toomre D, Diaz E, White J, Simons K: **Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells.** *Nat.Cell Biol.* 2001, **3**:140-149.

79. Kreitzer G, Schmoranz J, Low SH, Li X, Gan Y, Weimbs T, Simon SM, Rodriguez-Boulan E: **Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells.** *Nat.Cell Biol.* 2003, **5**:126-136.
80. Kundu A, Avalos RT, Sanderson CM, Nayak DP: **Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells.** *J.Virol.* 1996, **70**:6508-6515.
81. Kuroda S, Fukata M, Kobayashi K, Nakafuku M, Nomura N, Iwamatsu A, Kaibuchi K: **Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1.** *J.Biol.Chem.* 1996, **271**:23363-23367.
82. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
83. Lalli G, Hall A: **Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex.** *J.Cell Biol.* 2005, **171**:857-869.
84. Langevin J, Morgan MJ, Sibarita JB, Aresta S, Murthy M, Schwarz T, Camonis J, Bellaiche Y: **Drosophila exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane.** *Dev.Cell* 2005, **9**:365-376.
85. Le Bivic A, Quaroni A, Nichols B, Rodriguez-Boulan E: **Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line.** *J.Cell Biol.* 1990, **111**:1351-1361.
86. Lipschutz JH, Lingappa VR, Mostov KE: **The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:20954-20960.
87. Lisanti MP, Sargiacomo M, Graeve L, Saltiel AR, Rodriguez-Boulan E: **Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988, **85**:9557-9561.
88. Lisanti MP, Caras IW, Davitz MA, Rodriguez-Boulan E: **A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells.** *J.Cell Biol.* 1989, **109**:2145-2156.
89. Liu J, Zuo X, Yue P, Guo W: **Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells.** *Mol.Biol.Cell* 2007, **18**:4483-4492.
90. Lopez JA, Kwan EP, Xie L, He Y, James DE, Gaisano HY: **The RalA GTPase is a central regulator of insulin exocytosis from pancreatic islet beta cells.** *J.Biol.Chem.* 2008, **283**:17939-17945.
91. Matlin KS, Simons K: **Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation.** *Cell* 1983, **34**:233-243.
92. Moskalenko S, Henry DO, Rosse C, Mirey G, Camonis JH, White MA: **The exocyst is a Ral effector complex.** *Nat.Cell Biol.* 2002, **4**:66-72.

93. Moskalenko S, Tong C, Rosse C, Mirey G, Formstecher E, Daviet L, Camonis J, White MA: **Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions.** *J.Biol.Chem.* 2003, **278**:51743-51748.
94. Mostov KE, de Bruyn KA, Deitcher DL: **Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis.** *Cell* 1986, **47**:359-364.
95. Mostov KE, Verges M, Altschuler Y: **Membrane traffic in polarized epithelial cells.** *Curr.Opin.Cell Biol.* 2000, **12**:483-490.
96. Munson M, Novick P: **The exocyst defrocked, a framework of rods revealed.** *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2006, **13**:577-581.
97. Müsch A, Cohen D, Kreitzer G, Rodriguez-Boulán E: **cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network.** *EMBO J.* 2001, **20**:2171-2179.
98. Müsch A: **Microtubule organization and function in epithelial cells.** *Traffic.* 2004, **5**:1-9.
99. Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ: **Biosynthesis of the human sucrase-isomaltase complex. Differential O-glycosylation of the sucrase subunit correlates with its position within the enzyme complex.** *J.Biol.Chem.* 1988, **263**:7242-7253.
100. Nejsum LN, Nelson WJ: **A molecular mechanism directly linking E-cadherin adhesion to initiation of epithelial cell surface polarity.** *J.Cell Biol.* 2007, **178**:323-335.
101. Novick P, Field C, Schekman R: **Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway.** *Cell* 1980, **21**:205-215.
102. Ohno H, Tomemori T, Nakatsu F, Okazaki Y, Aguilar RC, Foelsch H, Mellman I, Saito T, Shirasawa T, Bonifacino JS: **Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells.** *FEBS Lett.* 1999, **449**:215-220.
103. Oka T, Krieger M: **Multi-component protein complexes and Golgi membrane trafficking.** *J.Biochem.* 2005, **137**:109-114.
104. Oztan A, Silvis M, Weisz OA, Bradbury NA, Hsu SC, Goldenring JR, Yeaman C, Apodaca G: **Exocyst requirement for endocytic traffic directed toward the apical and basolateral poles of polarized MDCK cells.** *Mol.Biol.Cell* 2007, **18**:3978-3992.
105. Paladino S, Pocard T, Catino MA, Zurzolo C: **GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells.** *J.Cell Biol.* 2006, **172**:1023-1034.
106. Parton RG, Simons K: **The multiple faces of caveolae.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2007, **8**:185-194.
107. Peränen J, Auvinen P, Virta H, Wepf R, Simons K: **Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts.** *J.Cell Biol.* 1996, **135**:153-167.
108. Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulán E: **Evolving endosomes: how many varieties and why?** *Curr.Opin.Cell Biol.* 2005, **17**:423-434.

109. Polishchuk R, Di Pentima A, Lippincott-Schwartz J: **Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway.** *Nat.Cell Biol.* 2004, **6**:297-307.
110. Rana TM: **Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2007, **8**:23-36.
111. Rittmeyer EN, Daniel S, Hsu SC, Osman MA: **A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis.** *J.Cell Sci.* 2008, **121**:391-403.
112. Rodriguez-Boulau E, Kreitzer G, Musch A: **Organization of vesicular trafficking in epithelia.** *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005, **6**:233-247.
113. Rogers KK, Wilson PD, Snyder RW, Zhang X, Guo W, Burrow CR, Lipschutz JH: **The exocyst localizes to the primary cilium in MDCK cells.** *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2004, **319**:138-143.
114. Rosse C, Hatzoglou A, Parrini MC, White MA, Chavrier P, Camonis J: **RalB mobilizes the exocyst to drive cell migration.** *Mol.Cell Biol.* 2006, **26**:727-734.
115. Sans N, Prybylowski K, Petralia RS, Chang K, Wang YX, Racca C, Vicini S, Wenthold RJ: **NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex.** *Nat.Cell Biol.* 2003, **5**:520-530.
116. Scheiffele P, Peranen J, Simons K: **N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells.** *Nature* 1995, **378**:96-98.
117. Scheiffele P, Roth MG, Simons K: **Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain.** *EMBO J.* 1997, **16**:5501-5508.
118. Schuck S, Simons K: **Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane.** *J.Cell Sci.* 2004, **117**:5955-5964.
119. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A: **Rab GTPases at a glance.** *J.Cell Sci.* 2007, **120**:3905-3910.
120. Shaw AS: **Lipid rafts: now you see them, now you don't.** *Nat.Immunol.* 2006, **7**:1139-1142.
121. Shen L, Weber CR, Turner JR: **The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state.** *J.Cell Biol.* 2008, **181**:683-695.
122. Shipitsin M, Feig LA: **RalA but not RalB enhances polarized delivery of membrane proteins to the basolateral surface of epithelial cells.** *Mol.Cell Biol.* 2004, **24**:5746-5756.
123. Simons K, Wandinger-Ness A: **Polarized sorting in epithelia.** *Cell* 1990, **62**:207-210.
124. Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**:569-572.
125. Sullivan CS, Pipas JM: **T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis.** *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2002, **66**:179-202.
126. Sztul E, Lupashin V: **Role of tethering factors in secretory membrane traffic.** *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2006, **290**:C11-C26.

127. Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH: **Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1.** *Cell* 1999, **97**:877-887.
128. TerBush DR, Novick P: **Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J.Cell Biol.* 1995, **130**:299-312.
129. TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P: **The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *EMBO J.* 1996, **15**:6483-6494.
130. Thompson A, Nessler R, Wisco D, Anderson E, Winckler B, Sheff D: **Recycling endosomes of polarized epithelial cells actively sort apical and basolateral cargos into separate subdomains.** *Mol.Biol.Cell* 2007, **18**:2687-2697.
131. Ting AE, Hazuka CD, Hsu SC, Kirk MD, Bean AJ, Scheller RH: **rSec6 and rSec8, mammalian homologs of yeast proteins essential for secretion.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995, **92**:9613-9617.
132. Turner MS, Sens P, Socci ND: **Nonequilibrium raftlike membrane domains under continuous recycling.** *Phys.Rev.Lett.* 2005, **95**:168301.
133. Van Itallie CM, Anderson JM: **Claudins and epithelial paracellular transport.** *Annu.Rev.Physiol* 2006, **68**:403-429.
134. van Meer G, Simons K: **Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions.** *EMBO J.* 1982, **1**:847-852.
135. van Meer G, Simons K: **The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells.** *EMBO J.* 1986, **5**:1455-1464.
136. Vega IE, Hsu SC: **The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth.** *J.Neurosci.* 2001, **21**:3839-3848.
137. Wang Q, Chen XW, Margolis B: **PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells.** *Mol.Biol.Cell* 2007, **18**:874-885.
138. Wehrle-Haller B, Imhof BA: **Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:12667-12674.
139. Wu H, Rossi G, Brennwald P: **The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis.** *Trends Cell Biol.* 2008, **18**:397-404.
140. Wu S, Mehta SQ, Pichaud F, Bellen HJ, Quirocho FA: **Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo.** *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2005, **12**:879-885.
141. Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulau E: **The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells.** *J.Cell Biol.* 1997, **139**:929-940.

142. Yeaman C, Grindstaff KK, Wright JR, Nelson WJ: **Sec6/8 complexes on trans-Golgi network and plasma membrane regulate late stages of exocytosis in mammalian cells.** *J.Cell Biol.* 2001, **155**:593-604.
143. Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ: **Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells.** *J.Cell Sci.* 2004, **117**:559-570.
144. Yoshimori T, Keller P, Roth MG, Simons K: **Different biosynthetic transport routes to the plasma membrane in BHK and CHO cells.** *J.Cell Biol.* 1996, **133**:247-256.
145. Yu MJ, Pisitkun T, Wang G, Aranda JF, Gonzales PA, Tchapyjnikov D, Shen RF, Alonso MA, Knepper MA: **Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct.** *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2008, **295**:C661-C678.
146. Zajac A, Sun X, Zhang J, Guo W: **Cyclical regulation of the exocyst and cell polarity determinants for polarized cell growth.** *Mol.Biol.Cell* 2005, **16**:1500-1512.
147. Zegers MM, O'Brien LE, Yu W, Datta A, Mostov KE: **Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro.** *Trends Cell Biol.* 2003, **13**: 169-176.
148. Zhang X, Bi E, Novick P, Du L, Kozminski KG, Lipschutz JH, Guo W: **Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:46745-46750.
149. Zhang X, Orlando K, He B, Xi F, Zhang J, Zajac A, Guo W: **Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42.** *J.Cell Biol.* 2008, **180**:145-158.
150. Zhang XM, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA, Rowe T: **Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells.** *J.Biol.Chem.* 2004, **279**:43027-43034.
151. Zuo X, Zhang J, Zhang Y, Hsu SC, Zhou D, Guo W: **Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration.** *Nat.Cell Biol.* 2006, **8**:1383-1388.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

AA	amino acid
Abb	Ab bildung
ADP	A denosin d iphosphat
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole p roprionic acid
AP	A dapter- P rotein
AQP	a quaporin
Arf	A DP-ribosylation factor
AS	A minosäure
CD	cluster of d ifferentiation
CLIP	c ytoplasmic l inker p rotein
COG	conserved o ligomeric G olgi
COS	CV -1, O origin, SV 40
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
ddH ₂ O	d oppelt d estilliertes Wasser
DEAE	D iethylaminoethyl
DE-Cadherin	d rosophila e pithelial-Cadherin
DLG	d iscs l arge
DMEM	D ulbecco's m odified E agle's m edium
DNS	D esoxyribonukleinsäure
DRM	d etergent resistant m embrane (Detergenz resistente Membran)
E-Cadherin	e pithelial-Cadherin
EE	E arly E ndosome (Frühes Endosom)
ER	Endoplasmatisches R etikulum
ERGIC	ER - G olgi intermediate c ompartment
FRT	F ischer R at T hyroid
GaM	G oat anti- M ouse (Ziege gegen-Maus)
GaRb	G oat anti- R abbit (Ziege gegen-Hase)
GARP	G olgi associated retrograde p rotein
GGA	G olgi localizied, g amma ear containing, A rf binding
GLUT	G lukose T ransporter
gp	g lykoprotein
GPI-AP	g lycosyl p hosphatidylinositol-anchored protein
GST	G lutathion- S - T ransferase
GTP	G uanosin t riphosphat
HA	H ä m agglutinin
HRP	h orseradish p eroxidase (Meerrettich Peroxidase)
IB	I mmunoblot
IEF	I soelektrische F okussierung
IF	I mmunfluoreszenz
IP	I mmun p räzipitation
I _d	l iquid d isordered
LDLR	l ow d ensity lipoprotein receptor
LLC-PK1	Nierenepithelzellen vom Schwein, denen die μ 1B-Untereinheit fehlt
I _o	l iquid o rded
LPH	L aktase P hlorizin H ydrolase
mAb	m onoclonale A ntibody (monoklonaler Antikörper)
MALDI	m atrix assisted laser d esorbtions ionization

MDCK	M adin D arby C anine K idney
MEM	M inimal E ssential M edium
NA	N euraminidase
NMDA	N -methyl- D -aspartate
NRK	N ormal R at K idney
p75 ^{NTR}	N eurotrophinrezeptor (75 kDa)
PAA	P olyacrylamid
pAb	p olyclonale A ntibody (polyklonaler Antikörper)
PAS	P rotein- A - S epharose
PDZ	P SD95, D LG, Z O-1
PI	P rotease I nhibitoren
pIgR	p olymere I mmunglobulin R ezeptor
PIP	P hosphatidylinositol p hosphat
PLAP	p lazentare a lkalische P hosphatase
PM	P lasmamembran
pmol	p icco m ol
PSD95	P ostsynaptic d ensity protein-95
Rab	R as like in b rain
Ral	R as like
RE	R ecycling E ndosome (Recycling Endosom)
RG	R eaktionsgefäß
rGH	r at g rowth h ormon
RNA	r ibonucleic a cid
RT	R aum t emperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SI	S accharase- I somaltase (sucrase isomaltase)
siRNA	s hort i nterfering R NA
SNARE	s oluble N -ethymaleimid sensitive factor a ttachment protein r eceptor
SV40	s imian v irus 40
TC10	k leine G TPase
Tctex-1	t complexed t estis e xpressed one
TfR	t ransferrin receptor
TGN	t rans- G olgi N etzwerk
TJ	T ight J unction
TOF	t ime o f f light
TRAPP	t ransport p rotein p article
v/v	v olume in v olume
VIP17	v esicular i ntegral p rotein-17
VSV-G	v esicular s tomatitis v irus- g lycoprotein
w/v	w eight in v olume
WT	W ildtyp
z.B.	z um B eispiel
ZO-1	Z onula O ccludens-1

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1.1	Die Epithelzelle	3
1.2	Modell eines synaptischen Vesikels	3
1.3	Modelle zur Sortierung und Vesikelformation im apikalen Transport	10
1.4	TGN und Endosomen	11
1.5	Lokalisation des Exocyst-Komplexes	18
1.6	Modell der Vesikelbindung	18
2.1	Modell eines Transmembranfilters	33
3.1	2D-Gel	45
3.2	Fraktionen, Vesikel-IPs und Co-IP	48
3.3	siRNA-Test und Oberflächen-IPs mit MDCK-SI-Zellen	51
3.4	Mikroskopische Untersuchung von SI-YFP und Sec6/8 in COS-7-Zellen	54
3.5	Sec6 und endosomale Kompartimente in COS-7-Zellen	56
3.6	MDCK-SI-YFP-Zellen nach TGN-Temperaturblock und 20 min TGN-Release	58
3.7	Sec8 ist mit DRMs aus MDCK-SI-Zellen assoziiert	60

Tabelle	Bezeichnung	Seite
2.1	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	23-24
2.2	Immunologische Reagenzien	28
2.3	Zelllinien und Zellkulturmedien	30
2.4	Trenngele	43

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität waren die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Basler, Barth, Baum, Boekhoff, Boudriot, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Gerdes, Gress, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Herrmann-Lingen, Hilt, Hörle, Hoyer, Jerrentrup, Jungclas, Kill, Klose, Köhler, Koolman, Krause, Krebber, Krieg, Kroll, Kühnert, Lang, Leonhardt, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Max, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schrader, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Weiler, Werner, Westermann, Wulf

7.4 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Ralf Jacob für die Vergabe des interessanten Themas und dem Vertrauen, dass er mir entgegen brachte, bedanken. Seine freundliche Art und der unkomplizierte Umgang miteinander, sorgten für ein angenehmes und gutes Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Catharina Cramm-Behrens für die tolle Betreuung meiner Arbeit bedanken. Catharina arbeitete mich in die verwendeten Methoden ein und stand mir bei vielen Experimenten mit Tatkraft und konstruktiven Ratschlägen zur Seite. Zudem hatte sie immer ein offenes Ohr für aufkommende Fragen und Probleme.

Weiter bedanken möchte ich mich bei Martina Dienst und Waltraud Ackermann, die mir bei vielen Experimenten behilflich zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Christoph Greb, Dominik Schneider, Franz Martin Hess, Tamara Straube, Dr. Annett Koch und Ksenia Astanina. Es hat immer Spaß gemacht mit ihnen zu arbeiten, zu diskutieren und zu scherzen.

Frau Dr. Alexandra Elli möchte ich ganz besonders für die Durchsicht und Korrekturvorschläge der vorliegenden Arbeit danken.

Ganz großer Dank gebührt meinen Eltern, ohne deren Hilfe dieses Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.